

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



**Producción y liberación de proteínas heterólogas en mutantes
de *Saccharomyces cerevisiae* afectados en la integridad
celular**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Pablo Álvarez Álvarez

Directores

César Nombela Cano

María Molina Martín

Madrid

ISBN: 978-84-8466-801-5

© Pablo Álvarez Álvarez, 1995

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

**PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS
HETERÓLOGAS EN MUTANTES DE *Saccharomyces cerevisiae*
AFECTADOS EN LA INTEGRIDAD CELULAR**

**Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Farmacia**

Autor: PABLO ÁLVAREZ ÁLVAREZ


**Directores: Dr. CÉSAR NOMBELA CANO
Dra. MARÍA MOLINA MARTÍN**

Madrid, 1995

**CÉSAR NOMBELA CANO, CATEDRÁTICO-DIRECTOR
DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD
DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID,**

CERTIFICA: Que D. PABLO ÁLVAREZ ÁLVAREZ ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Dres. César Nombela Cano y María Molina Martín, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia con el título: "Producción y liberación de proteínas heterólogas en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* afectados en la integridad celular".

Y para que conste, firmo la presente certificación en Madrid a
16 de Marzo de 1995



César Nombela

Fdo.: Prof. César Nombela Cano.

A mi familia

A Quiqui

AGRADECIMIENTOS

En la conclusión de este trabajo me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que lo han hecho posible contribuyendo de alguna forma.

A los Dres. César Nombela y María Molina, por la dirección de este trabajo y por su constante apoyo y estímulo durante estos años de trabajo común.

A los Dres. César Nombela y Julio Rodríguez Villanueva, por sus consejos iniciales que me acercaron al mundo de la investigación de una forma seria y responsable.

Al resto del profesorado del Departamento de Microbiología II, en los que siempre encontré consejo y ayuda.

Al Dr. Jesús de la Fuente, por su paciente ayuda en el manejo del fermentador.

A Marta Sampedro, por su colaboración y amistad en el desarrollo de este trabajo durante su estancia en el laboratorio.

A Federico Navarro, por su amistad y ayuda informática desinteresada en los momentos más insospechados del día.

A todos mis compañeros de la unidad 3: a Humberto, por la sensación de calma que transmite y su capacidad para permanecer inmutable ante el cumplimiento de las "Leyes de Murphy"; a Víctor, por su fomento de la cultura musical de la unidad; a María Yuste, por su ayuda desinteresada; a Antonia por las interesantes tertulias mantenidas en estos años; a María Soler, por ser el contrapeso ideal de Humberto y obsequiarnos con su constante desafío a la fuerza centrífuga en las curvas; a Javier Jiménez, por sus inestimables ayudas en busca de los "papeles perdidos"; sin olvidar a los recién llegados, Inmaculada, José María y Mariano.

A todos mis compañeros de las diferentes unidades del Departamento, por los buenos ratos que hemos pasado juntos estos años.

A Maribel García y Alberto Álvarez, por su colaboración en este trabajo desde los servicios de Secuenciación Automatizada de DNA y de Citometría de Flujo, respectivamente.

A todo el personal auxiliar del Departamento por su ayuda en todo momento.

Quiero agradecer a mis padres y hermanos su apoyo y constante preocupación por el desarrollo de este trabajo, principalmente a mis padres por el espíritu de trabajo que me han inculcado. Tampoco olvido los sabios consejos de mi abuela durante estos años.

Por último, especialmente quiero agradecer a Gloria su apoyo y confianza constantes durante este tiempo, pieza muy importante en la culminación de este trabajo; sin olvidar su inestimable ayuda en la elaboración de esta memoria, siempre eficaz y paciente. Gracias Quiqui.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una Beca de la Fundación Caja de Madrid durante el período 1991-1994.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	absorbancia
AcCoA	acetil coenzima A
AE	actividad enzimática
ATP	adenosín trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
CAT	cloranfenicol acetil transferasa
CIAP	fosfatasa alcalina de intestino de ternera
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
DPR	liberación diferencial de productos
DTNB	5-5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)
Δ	delección
EC	extracto celular
EDTA	ácido etilén diamino tetra-acético
EtBr	bromuro de etidio
FTTC	isotiocianato de fluoresceína
g	fuerza equivalente a la gravedad
g	gramos
h	hora
IP	ioduro de propidio
IPTG	isopropil-tiogalactósido
Kb	kilobases
kD	1000 Daltons
l	litro
M	molar
MAP	proteína activada por mitógenos
mA	miliamperios
MCS	sitio de clonación múltiple
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
mmol	milimol
μ g	microgramos
μ l	microlitros
ng	nanogramo
nm	nanómetro
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
PNP	paranitrofenol
PrA	proteínasa A
PrB	proteínasa B
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
SN	sobrenadante de medio de cultivo
TE	tampón Tris-EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UE	unidades enzimáticas
V	voltios
VLPs	virus-like particles
V/V	volumen/volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EN <i>S. cerevisiae</i>	3
3. PROCESO DE TRANSFORMACIÓN.....	3
3.1. Sistemas de transformación.....	3
3.1.1. Transformación por medio de protoplastos.....	3
3.1.2. Transformación de células enteras.....	3
3.1.3. Transformación por electroporación.....	4
3.2. Marcadores de selección.....	4
3.2.1. Marcadores de selección auxotróficos.....	4
3.2.2. Marcadores de selección dominantes.....	4
3.3. Tipos básicos de vectores.....	5
4. VECTORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN <i>S. cerevisiae</i>	5
4.1. Sistemas de promotores.....	5
4.1.1. Promotores de la ruta glicolítica.....	6
4.1.2. Promotores regulables.....	6
4.1.3. Promotores híbridos.....	7
4.2. Terminadores de la transcripción.....	8
4.3. Modificaciones en el gen heterólogo.....	8
4.3.1. Uso de cDNA.....	8
4.3.2. Uso de codones. Genes sintéticos.....	8
4.3.3. Adición de secuencia señal. Glicosilación.....	9
4.4. Estabilidad del vector de expresión.....	9
5. CEPAS HOSPEDADORAS PARA LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE GENES.....	11
5.1. Cepas deficientes en proteasas.....	11
5.1.1. Proteasas en <i>S. cerevisiae</i> y expresión heteróloga.....	11
5.2. Cepas supersecretoras y de baja glicosilación.....	12
5.3. Cepas que facilitan la liberación de proteínas heterólogas intracelulares.....	13
6. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS INTRACELULARES DE <i>S. cerevisiae</i>	13
6.1. Rotura celular de <i>S. cerevisiae</i>	14
6.1.1. Métodos químicos.....	15
6.1.2. Métodos físicos.....	15
6.1.3. Métodos biológicos.....	15
6.1.3.1. Uso de enzimas líticos.....	16
6.1.3.2. Uso de mutantes líticos condicionales.....	16
7. GEN <i>SLT2</i> DE <i>S. cerevisiae</i>	17
7.1. Funciones de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	17
7.2. Pared celular y gen <i>SLT2</i>	17
7.3. Otras características del fenotipo <i>slt2</i>	18

8. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS DE INTERÉS	
EN <i>S. cerevisiae</i>	19
8.1. Cloranfenicol acetil transferasa (CAT).....	19
8.2. Expresión de la proteína HLA-DP de clase II en <i>S. cerevisiae</i>	19
8.3. Expresión de Ty-VLPs de <i>S. cerevisiae</i>	20
9.LEVADURAS NO CONVENCIONALES.....	20
9.1. Expresión de genes heterólogos en <i>P. pastoris</i>	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	24
1.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	24
1.2. Cepas de <i>E. coli</i>	24
1.3. Plásmidos.....	24
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	24
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	24
2.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	25
3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	26
3.1. Condiciones de crecimiento y conservación de cepas.....	26
3.1.1. Cepas de <i>E. coli</i>	26
3.1.2. Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	26
3.1.2.1. Crecimiento en fermentador.....	26
3.1.2.1.1. Cultivos discontinuos.....	26
3.1.2.1.2. Cultivo alimentado.....	26
3.2. Determinación del crecimiento.....	27
3.2.1. Turbidimetría.....	27
3.2.2. Recuento de células.....	27
3.2.3. Cálculo de biomasa.....	27
3.3. Determinación del número de viables.....	27
3.3.1. Por citometría de flujo.....	27
3.4. Técnicas de microscopía.....	28
3.4.1. Microscopía de contraste de fases.....	28
3.5. Técnicas genéticas.....	28
3.5.1. Obtención de diploides.....	28
3.5.2. Esporulación.....	28
3.5.3. Disección de ascas.....	28
3.5.4. Ensayos genéticos en placa de mutaciones en los genes de proteasas.....	28
3.5.4.1. Ensayo de actividad proteasa A, test APE.....	29
3.5.4.2. Ensayo de actividad proteasa B, test HPA.....	29
4. MANIPULACIÓN DE DNA. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	29
4.1. Soluciones tampón utilizados.....	29

4.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	29
4.3. Aislamiento de DNA y RNA total de células de levadura.....	29
4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	29
4.5. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.....	30
4.6. Determinación del tamaño, pureza y concentración de DNA.....	30
4.7. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.....	30
4.8. Desfosforilación del extremo 5' del DNA.....	30
4.9. Ligación del DNA.....	31
4.10. Transformación del DNA.....	31
4.11. Hibridación DNA-DNA.....	31
4.11.1. Marcaje no radiactivo de fragmentos de DNA con digoxigenina.....	31
4.11.2. Transferencia de DNA. Detección de secuencias específicas.....	31
4.12. Hibridación RNA-DNA.....	32
4.12.1. Marcaje no radiactivo de fragmentos de DNA con biotina.....	32
4.12.2. Transferencia de RNA. Detección de secuencias específicas.....	32
4.13. Secuenciación de DNA.....	32
4.14. Amplificación de DNA mediante PCR.....	32
4.14.1. Clonación de los productos de PCR.....	33
5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	33
5.1. Preparaciones de proteínas.....	33
5.1.1. Obtención de células y sobrenadantes de cultivo.....	33
5.1.2. Preparación de extractos celulares.....	33
5.1.3. Obtención de proteínas intracelulares por choque osmótico.....	34
5.2. Valoración de fosfatasa alcalina en <i>S. cerevisiae</i>	34
5.2.1. Valoración cualitativa.....	34
5.2.2. Valoración cuantitativa.....	34
5.3. Valoración de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en <i>S. cerevisiae</i>	35
5.4. Determinación cuantitativa de proteínas.....	35
5.4.1. Método de Bradford.....	35
5.4.2. Método espectrofotométrico.....	35
5.5. Electroforesis de proteínas.....	36
5.5.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	36
5.6. Revelado de proteínas en geles de poliacrilamida.....	36
6. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	36
6.1. Transferencia de proteínas e inmunodetección.....	36
6.2. Marcaje intracitoplasmático de células de levadura. Detección mediante citometría de flujo.....	36

III. RESULTADOS	38
1. PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN CEPAS AUTOLÍTICAS DE <i>S. cerevisiae</i>	39
1.1. Liberación de proteínas heterólogas al medio de cultivo por la cepa autolítica LD1 de <i>S. cerevisiae</i> mediante choque térmico	39
1.1.1. Producción de CAT en la cepa LD1. Ensayo en matraz	39
1.1.2. Estudio de la producción y liberación de CAT al medio de cultivo	40
1.1.3. Concentración de CAT liberado al medio de cultivo	42
1.1.4. Perfil electroforético de las proteínas liberadas al medio de cultivo	43
1.2. Estudio de la cepa LD1 a escala semiindustrial	43
1.2.1. Estudio de la capacidad y velocidad de crecimiento de la cepa LD1	43
1.2.1.1. Crecimiento en medio sintético completo	43
1.2.1.2. Crecimiento en medio complejo	44
1.2.2. Estudio de la capacidad y velocidad de crecimiento de la cepa LD1 transformada con el plásmido pCH100L	44
1.2.3. Efecto de un choque térmico en un cultivo de LD1/pCH100L creciendo en fermentación alimentada	45
2. DESARROLLO DE CEPAS LÍTICAS DE <i>S. cerevisiae</i> DEFICIENTES EN PROTEASAS. LIBERACIÓN Y ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS	46
2.1. Obtención de mutantes autolíticos de <i>S. cerevisiae</i> deficientes en proteasas	46
2.1.1. Uso de cruces genéticos	46
2.2. Análisis del fenotipo <i>slt2</i> en las ascosporas	47
2.2.1. Sensibilidad de las ascosporas a concentraciones 12 mM de cafeína	47
2.2.2. Capacidad de crecimiento y lisis a 37°C	47
2.2.3. Estabilización osmótica de la lisis producida por cafeína (12 mM) y por temperatura (37°C)	48
2.3. Análisis de fenotipo deficiente en proteasas <i>PEP4</i> y <i>PRB1</i>	48
2.4. Análisis del fenotipo lítico mediante citometría de flujo de los mutantes líticos deficientes en proteasas obtenidos en el cruce genético	49
2.5. Estudio de la lisis y liberación de proteínas de la cepa LHDP1. Ensayos en matraz	50
2.6. Liberación y estabilidad de las proteínas liberadas en cultivos en fermentador de la cepa LHDP1/pCH100L	51
2.7. Perfil electroforético de las proteínas liberadas en un choque térmico de la cepa LHDP1 en fermentador	52

2.8. Obtención de mutantes autolíticos deficientes en proteasas por interrupción del gen <i>SLT2</i> en la cepa BJ5464.	52
2.9. Medida de la lisis en la cepa LDKP1 por citometría de flujo.	53
3. LIBERACIÓN de PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN MUTANTES AUTOLÍTICOS DE <i>S. cerevisiae</i> POR CHOQUE OSMÓTICO.	54
3.1. Ensayos preliminares de choque osmótico en la cepa LHDP1.	54
3.2. Medida de la lisis en un choque osmótico por citometría de flujo.	54
3.3. Perfil electroforético de las proteínas liberadas al medio de cultivo por choque osmótico.	55
3.4. Liberación de CAT por choque osmótico en cepas líticas de <i>S. cerevisiae</i>	55
3.4.1. Estudio de la influencia del tiempo en la liberación de proteínas por choque osmótico.	56
3.5. Concentración de proteínas liberadas mediante un choque osmótico.	56
4. LIBERACIÓN DE VLPs (Virus-like particles) EN MUTANTES AUTOLÍTICOS DE <i>S. cerevisiae</i>	57
5. CLONACIÓN DEL GEN HOMÓLOGO DE <i>SLT2</i> DE <i>S. cerevisiae</i> EN LA LEVADURA <i>P. pastoris</i>	57
5.1. Hibridaciones DNA-DNA heterólogas.	58
5.2. Desarrollo de una sonda genética para la clonación del gen homólogo de <i>SLT2</i> en <i>P. pastoris</i>	58
6. EXPRESIÓN DE HLA-DP EN <i>S. cerevisiae</i> Y LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS.	59
6.1. Desarrollo de formas solubles de HLA-DP.	60
6.1.1. Desarrollo de un vector de expresión de <i>S. cerevisiae</i> para las formas solubles de HLA-DP.	61
6.1.2. Estudio de la expresión de HLA-DP en <i>S. cerevisiae</i>	62
6.1.2.1. Detección de mRNA de la forma soluble de HLA-DP.	62
6.1.2.2. Detección de la proteína HLA-DP soluble.	62
6.1.3. Clonación de HLA-DP soluble en vectores de expresión de células de ratón.	63
6.2. Desarrollo de un gen quimérico de HLA-DP.	63
6.2.1. Diseño de los oligonucleótidos.	64
6.2.2. Clonación del gen quimera de HLA-DP en vectores de expresión de <i>S. cerevisiae</i> y de líneas celulares de ratón.	65

IV. DISCUSIÓN	66
1. LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN MUTANTES AUTOLÍTICOS DE <i>S. cerevisiae</i>	67
2. LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS POR CHOQUE OSMÓTICO.....	71
3. COMPARACIÓN DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS INTRACELULARES CON OTROS SISTEMAS DE LIBERACIÓN.....	72
4. AMPLIACIÓN DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS BASADO EN EL EMPLEO DE MUTANTES AUTOLÍTICOS A OTRAS ESPECIES DE LEVADURA.....	74
5. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HLA-DP DE CLASE II EN <i>S. cerevisiae</i>	75
V.CONCLUSIONES	77
VI. BIBLIOGRAFÍA	79
VII. ANEXO	91

I. INTRODUCCIÓN

1. APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.

La Biotecnología es el uso de la Microbiología, la Bioquímica y la Ingeniería de una forma integrada con el objetivo de utilizar los microorganismos y los cultivos celulares para manufacturar productos útiles. Es una rama de la Ciencia que ha existido desde los orígenes de la civilización donde ya se realizaban fermentaciones para la obtención de productos como la cerveza y el vino. En los últimos 25 años se ha visto rejuvenecida con el desarrollo de la Biología Molecular y de las técnicas de Ingeniería Genética. Hasta ese momento la parte central de la Biotecnología la constituía la Microbiología Industrial, que tenía como campo principal de trabajo en la segunda mitad de este siglo el desarrollo de la producción de antibióticos y la manufactura a gran escala de enzimas y productos usados en la industria alimentaria. La aparición de la Ingeniería Genética ha permitido la modificación de los microorganismos y el desarrollo de la expresión heteróloga de proteínas en sistemas microbianos y líneas celulares, generando un elevado número de nuevos productos.

La levadura *S. cerevisiae* es actualmente una poderosa herramienta biotecnológica. Esto ha sido posible debido al conocimiento previo de su comportamiento a gran escala, debido a su uso en fermentaciones tradicionales y el elevado grado de conocimiento a nivel genético y bioquímico que se posee de la misma. Por lo tanto la combinación de los avances de la Biología Molecular con el alto grado de conocimiento acerca de esta levadura han dado como resultado la comprensión de los mecanismos moleculares de muchos de sus procesos biológicos, permitiendo su explotación con fines de producción de proteínas heterólogas con interés comercial. De hecho, la primera vacuna de origen recombinante aprobada para su uso en humanos, vacuna contra la hepatitis B, y el primer producto de origen recombinante aprobado para su uso alimentario, renina, han sido producidos en esta especie de levadura; existiendo actualmente varias proteínas de origen recombinante con interés terapéutico en fase de ensayo clínico.

El rápido auge de *S. cerevisiae* en el campo de la expresión heteróloga se justifica por una serie de ventajas, entre las que destacan: que es un organismo reconocido como seguro por la FDA de tipo GRAS (Generally Recognized As Safe) por su tradicional uso en la industria alimentaria; esto contrasta con los problemas de *E. coli*, que presenta en su pared materiales tóxicos de tipo pirogénico o los sistemas celulares de mamífero susceptibles de ser portadores de oncogenes o DNA viral, lo que obliga a que los productos obtenidos en estos sistemas tengan que ser controlados con más exigencia que los producidos en la levadura. También destaca por la facilidad de crecimiento y el bajo coste de los medios de cultivo, lo cual la aproxima a sistemas procariotas del tipo *E. coli*. Por último, al ser un organismo eucariota, es capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales más parecidas a los eucariotas superiores, de los que suelen proceder las proteínas que van a ser producidas, y también puede secretar proteínas de una forma eficiente. Todo ello hace de *S. cerevisiae* un organismo apto para la expresión de proteínas heterólogas tanto de forma intracitoplásmica como por la ruta de secreción (Tabla I).

Tabla I. Ejemplos de proteínas heterólogas de interés expresadas en *S. cerevisiae*.

Proteína	Uso	Expresión	Referencia
HB Engerix ^R	Vacuna Hepatitis B	Intracelular	Valenzuela <i>et al.</i> , 1982
Malaria CS	Vacuna Malaria	Intracelular	Barr <i>et al.</i> , 1987a
env2-3 HIV	Vacuna HIV	Intracelular	Barr <i>et al.</i> , 1987b
Proinsulina humana	Tratamiento diabetes	Intracelular	Cousens <i>et al.</i> , 1987
SODh	Tratamiento daño isquémico	Intracelular	Hallewell <i>et al.</i> , 1987
FGFh	Reparación tejidos	Intracelular	Barr <i>et al.</i> , 1988
Antitripsina	Enfisema pulmonar	Intracelular	Rosenberg <i>et al.</i> , 1984
HCV	Detección en sangre anticuerpos HCV	Intracelular	Kuo <i>et al.</i> , 1989
EGFh	Reparación tejidos	Secreción	Brake <i>et al.</i> , 1984
Insulina humana	Tratamiento diabetes	Secreción	Thim <i>et al.</i> , 1986
PDGFh	Reparación tejidos	Secreción	Ostman <i>et al.</i> , 1989
GM-CSFh	Tratamiento neutropenia	Secreción	Cantrell <i>et al.</i> , 1985
IGF-1h	Tratamiento osteoporosis	Secreción	Brake <i>et al.</i> , 1984

CS: circumesporozoito; EGFh: factor de crecimiento epidérmico humano; FGFh: factor de crecimiento de fibroblastos humano; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; HCV: virus hepatitis C; HIV: virus de la inmunodeficiencia humana; IGFh: factor de crecimiento tipo insulina humano; PDGFh: factor de crecimiento derivado de plaquetas humano; SODh: superóxido dismutasa humana.

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS EN *S. cerevisiae*.

La expresión heteróloga de proteínas es un proceso complicado con múltiples factores en juego. Hay que tener en cuenta desde el sistema de transformación hasta la fase final consistente en la recuperación y purificación de la proteína de interés. Sin olvidar el desarrollo de un vector de expresión y las modificaciones a las que hay que someter al gen heterólogo que se desea expresar. También hay que estudiar el tipo de cepa hospedadora en cada caso, así como las mejoras que se puedan realizar en las mismas. Por último es necesario, sobre todo desde un punto de vista industrial, el desarrollo de técnicas que permitan el salto de escala a fin de poder rentabilizar el proceso.

3. PROCESO DE TRANSFORMACIÓN.

El proceso de transformación consiste en inducir un estado de competencia en la célula que permita la introducción de DNA exógeno, en este caso el vector de expresión. Conviene no olvidar que el proceso de transformación es ligeramente mutagénico, tanto para la célula hospedadora (Shortle *et al.*, 1984) como para el DNA introducido (Clancy *et al.*, 1984); no obstante debido a la baja frecuencia de mutación no representa un mayor problema en este tipo de transformaciones. Lo que si que hay que tener en cuenta a la hora de optimizar la expresión de una proteína es el análisis de varios transformantes ya que es frecuente encontrar diferencias de productividad entre ellos de forma no claramente explicada hasta la fecha, especialmente en vectores de expresión derivados del plásmido de 2 μ , en los que se observan variaciones en el número de copias de plásmido.

3.1. Sistemas de transformación.

En la actualidad existen tres métodos de transformación descritos para *S. cerevisiae*.

3.1.1. Transformación por medio de protoplastos.

Fue el primer método descrito. Consiste en el tratamiento de las células con un complejo enzimático hidrolítico que degrada la pared celular de la levadura generando protoplastos, en los que por medio de un tratamiento con calcio y polietilenglicol se logra la entrada del DNA exógeno (Beggs, 1978; Hinnen *et al.*, 1978). Los transformantes deben ser obtenidos en un medio selectivo isotónico, para que puedan regenerar la pared celular.

3.1.2. Transformación de células enteras.

Años más tarde Ito *et al.* (1983), desarrollaron un sistema de transformación de células enteras de levadura en el que el estado de competencia se induce por tratamiento de la pared celular con cationes, destacando el litio como el más efectivo. La eficiencia de este sistema era más baja que la lograda con el método de protoplastos, por lo que se han desarrollado variaciones que aumentan la frecuencia de transformación, siendo la más utilizada la adición de DMSO que

incrementa en 25 veces el número de transformantes (Hill *et al.*, 1991). Es el sistema más utilizado por la facilidad de su realización.

3.1.3. Transformación por electroporación.

Es el sistema más moderno y fácil de realizar. Fue desarrollado por Meilhoc *et al.* (1990), se basa en la exposición de la membrana celular a un pulso eléctrico de alta intensidad durante un tiempo del orden de milisegundos. Este choque eléctrico provoca una desorganización en la membrana celular, que se vuelve altamente permeable a las moléculas presentes en ese momento en el medio externo.

3.2. Marcadores de selección.

3.2.1. Marcadores de selección auxotróficos.

Son los más empleados, se basa en el uso de mutantes en la síntesis de algunos aminoácidos, de modo que la inclusión de las copias silvestres de los genes mutados en los vectores de transformación permite la selección de los transformantes. Los más utilizados son los genes de las rutas de biosíntesis de leucina (*LEU2*), triptófano (*TRP1*), histidina (*HIS3*) y uracilo (*URA3*). Existe una variante del gen *LEU2* con el promotor truncado, *LEU2-d* (Beggs, 1978) con un nivel muy bajo de expresión ya que utiliza un promotor del plásmido de 2 μ , lo que hace que los transformantes seleccionados por su capacidad para crecer en medios sin leucina, presenten un alto número de copias. Este tipo de vectores portadores del marcador *LEU2-d* requiere la transformación de la célula por el método de protoplastos. Por lo tanto una forma de regular el número de copias de un vector en una célula es la inclusión de este marcador *LEU2-d* junto con otro marcador *URA3*. Dependiendo de la selección utilizada, el número de copias de plásmido y por tanto el nivel de proteína producido, es mayor o menor (Loison *et al.*, 1989).

3.2.2. Marcadores de selección dominantes.

Su principal ventaja es que permiten la transformación de cepas de uso industrial carentes de mutaciones conocidas. No requieren el uso de medios selectivos para la selección de transformantes.

Los más utilizados se basan en la resistencia a antibióticos, destacando entre ellos el antibiótico aminoglicosídico G418 (Jiménez y Davies, 1980; Webster y Dickson, 1983), la higromicina (Gritz y Davies, 1983) y el cloranfenicol (Hadfield *et al.*, 1986). En general se deben de incubar los transformantes unas horas en medio no selectivo antes de iniciar la presión selectiva con el antibiótico (Beesley *et al.*, 1990). Otra precaución que se debe de tener con este tipo de transformantes es la eliminación de la presión selectiva durante la fase de inducción de la expresión de la proteína, ya que antibióticos como G418 pueden aumentar la incorporación errónea de aminoácidos por interferir con la función del ribosoma.

Un tipo diferente de marcador dominante está basado en la sensibilidad de algunas cepas de *S. cerevisiae* al cobre (*cup1*), utilizando como marcador el gen *CUP1* en presencia de

concentraciones de cobre que serían inhibitorias del crecimiento (Foget y Welch, 1982). Henderson *et al.* (1985) han utilizado este sistema para la transformación de cepas industriales de *S. cerevisiae*.

3.3. Tipos básicos de vectores.

Los vectores que se pueden emplear en la transformación de *S. cerevisiae* pueden ser de varios tipos atendiendo al número de copias y a su posible integración en el genoma de la célula. Dentro de los vectores no integrativos existen los de bajo número de copias: YCp y YRp. Los YRp, plásmidos replicativos, presentan como elemento autoreplicativo orígenes de replicación cromosomales (ARS) (Campbell, 1983), son bastante inestables durante los procesos de división celular. Los YCp, plásmidos centroméricos, añaden una secuencia correspondiente a una región centromérica del cromosoma (CEN) con lo que se mejora su estabilidad (Clarke y Carbon, 1980); por su bajo número de copias no son de gran utilidad en la expresión heteróloga de proteínas. Los plásmidos derivados del plásmido endógeno de 2μ , denominados episómicos (YE_p), son de alto número de copias, entre 50-100 copias por célula, lo que les hace ideales para su uso en la expresión heteróloga de proteínas, dado que una elevada dosis génica es uno de los factores que contribuyen a lograr una alta expresión.

Los vectores integrativos (YIp) carecen de secuencias autónomas de replicación, aprovechan la presencia de fenómenos de recombinación homóloga que ofrece *S. cerevisiae* para lograr su integración en el cromosoma (Orr-Weaver *et al.*, 1983).

Parent *et al.* (1985) han realizado una exhaustiva recopilación de los diferentes tipos de vectores disponibles en *S. cerevisiae*.

4. VECTORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN *S. cerevisiae*.

El vector de expresión es uno de los aspectos que ha recibido una mayor atención en el campo de la expresión de proteínas heterólogas, existiendo en la actualidad un amplísimo número de vectores de diferentes características que permiten llevar a cabo la expresión de una proteína de la forma más adecuada en cada caso.

En el desarrollo de un vector de expresión son varios los factores a tener en cuenta para su diseño: el tipo de promotor y de terminador, las modificaciones en el gen heterólogo y por último la estabilidad del vector en la célula.

4.1. Sistemas de promotores.

Tras la descripción de los sistemas de transformación de *S. cerevisiae* se iniciaron rápidamente los estudios sobre la expresión de genes heterólogos. Los primeros intentos se realizaron empleando los promotores de la proteína que se trataba de expresar; esto causaba fallos en la iniciación de la transcripción dando lugar a moléculas de mRNA aberrantes. Un ejemplo lo

representa el primer intento de producción de una proteína heteróloga, la β -globina de conejo (Beggs *et al.*, 1980). Tras esta observación se llegó a la conclusión acerca de la necesidad de emplear promotores de levadura para dirigir la transcripción de los genes heterólogos, siendo el primer ejemplo de proteína heteróloga producida de forma eficiente en *S. cerevisiae*, la producción de α -interferón bajo el promotor de la alcohol deshidrogenasa 1 (Hitzeman *et al.*, 1981).

Los promotores para dirigir la expresión de proteínas heterólogas deben de ser unos promotores fuertes, es decir pertenecientes a genes de la levadura con un alto nivel de expresión. Las características de los promotores de levadura, así como los factores que regulan la eficiencia y el inicio de la transcripción son ampliamente descritos por Struhl (1989). En un primer momento se centraron los esfuerzos en el aislamiento de promotores de genes de la ruta glicolítica, ya que eran genes de un alto nivel de expresión; más adelante se comprobó la necesidad de regular la expresión por lo que se buscaron promotores de expresión regulable. Recientemente se han desarrollado promotores híbridos que combinan varias características de los anteriores.

4.1.1. Promotores de la ruta glicolítica.

Como ya se ha comentado anteriormente los esfuerzos se centraron en el aislamiento de promotores de genes de dicha ruta debido al alto nivel de expresión de los mismos. Son los promotores de los genes de alcohol deshidrogenasa 1, *ADH1*, (Hitzeman *et al.*, 1981), 3-fosfoglicerato quinasa, *PGK*, (Tuite *et al.*, 1982) y gliceraldehído-3-fosfato, *GAPDH*, (Holland y Holland, 1980). En un principio se creía que eran de expresión constitutiva, más adelante se comprobó una disminución en su nivel de expresión si crecen en una fuente de carbono no fermentable. Estos promotores de tipo glicolítico son los más potentes de *S. cerevisiae* llegando a obtener en el caso del promotor del gen *PGK* el 5% del mRNA total. A pesar de su escasa regulación han sido ampliamente empleados tanto a escala de laboratorio como a escala industrial (Mc Aleer *et al.*, 1984).

4.1.2. Promotores regulables.

Con el paso del tiempo se comprobó la necesidad de lograr promotores que permitieran una expresión regulada de los genes heterólogos para evitar problemas de retraso en el crecimiento de las células originado por la carga adicional que suponen ciertas proteínas heterólogas expresadas de forma constitutiva. Para ello se desarrollaron promotores regulables por fuente de carbono y por fosfato.

Los promotores regulables por fuente de carbono tenían la característica de tener la transcripción inhibida en presencia de glucosa y se activaban por galactosa o por sacarosa.

Los promotores regulados por galactosa son dentro, de este grupo, los de expresión más fuerte y más finamente regulados de que se dispone en *S. cerevisiae*. Se basa en el empleo de los promotores de genes relacionados con el metabolismo de la galactosa (*GAL1*, *GAL7*, *GAL10*). La regulación de la transcripción por galactosa ha sido estudiada como un modelo de control de la transcripción en eucariotas (Johnston, 1987). El mRNA de dichos genes se induce rápidamente

unas 100 veces tras la eliminación de la glucosa del medio y la adición de galactosa (St. John and Davis, 1981).

La regulación por fosfato se basa en el uso del promotor de la fosfatasa ácida (*PHO5*) (Hinnen *et al.*, 1978), induciéndose su transcripción en ausencia de fosfato en el medio. Las características de este sistema han sido revisadas por Vogel y Hinnen (1990).

Por último un grupo de promotores de uso más restringido es el de los genes del metabolismo de la sacarosa. Son los promotores de los genes de la alcohol deshidrogenasa 2, *ADH2*, invertasa, *SUC2* e iso-citocromo c, *CYC1*. De ellos el más utilizado es el promotor del gen *ADH2* reprimido unas 100 veces en presencia de glucosa (Price *et al.*, 1990). Este grupo de promotores presenta una desventaja para su uso industrial; es difícil mantener una fina regulación por glucosa de los mismos en las condiciones en que es necesario crecer las células para alcanzar altos niveles de biomasa, ya que son condiciones de crecimiento con cantidades limitadas de glucosa con lo que la represión de estos promotores no es óptima.

4.1.3. Promotores híbridos.

Se han desarrollado con el fin de lograr sistemas de inducción regulados finamente combinando los promotores más fuertes con los sistemas de regulación existentes. Como hemos mencionado con anterioridad los promotores más fuertes son los de los genes de la ruta glicolítica, pero tiene en contra la escasa regulación de la transcripción que poseen. Por ello se construyeron promotores híbridos, combinando las zonas encargadas de regular la transcripción de unos con las zonas promotoras de los más fuertes. Algunos de los promotores híbridos descritos son los formados por: la región promotora del gen *PGK* con las regiones regulables de los promotores de los genes *GAL1-GAL10*, creándose el promotor *PGK/GAL* (Cousens *et al.*, 1990), la región promotora del gen *GAP* con las regiones reguladoras de los genes regulables por galactosa, promotor *GAP/GAL* (Bitter y Egan, 1988), la región promotora del gen *GAP* con las regiones reguladoras del promotor del gen *ADH2*, promotor *GAP/ADH2* (Cousens *et al.*, 1987) y la región promotora del gen *GAP* con la región reguladora del promotor del gen *PHO5*, promotor *GAP/PHO5* (Hinnen *et al.* 1989).

También se han desarrollado promotores de regulación esteroídica. Son unos promotores que pueden ser adaptados a cualquier cepa de *S. cerevisiae* con una inducción independiente de las condiciones del cultivo. Se basa en la observación de que los receptores de hormonas esteroídicas de mamíferos actúan como activadores transcripcionales en levaduras. Requieren la expresión simultánea del receptor glucocorticoide en la levadura y la inclusión en el promotor de levaduras de la región de respuesta a la señal transmitida por el receptor glucocorticoide en presencia de hormonas. Esto se ha llevado a cabo con el promotor del gen *CYC1* lográndose inducciones del orden de 100 veces (Schena *et al.*, 1991). Un sistema similar se ha desarrollado con el promotor del gen *PGK* colocando elementos de respuesta a andrógenos (Purvis *et al.*, 1991). Una de sus características más destacadas es su posible utilización en levaduras carentes de promotores finamente regulados como *Kluyveromyces lactis* y *Schizosaccharomyces pombe*.

4.2. Terminadores de la transcripción.

Toda cassette de expresión debe de llevar un terminador de la transcripción para asegurar una eficiente formación del extremo 3' del mRNA, ya que es uno de los factores críticos para lograr una alta expresión (Zaret y Sherman, 1982). Los terminadores de la transcripción más utilizados en la expresión heteróloga de proteínas proceden de los genes *TRP1* (Hitzeman *et al.*, 1983), *ADH1* (Urdea *et al.*, 1983), *GAP* (Rosenberg *et al.*, 1984) y *MF1* (Brake *et al.*, 1984), aunque también se puede utilizar un terminador presente en el plásmido de 2 μ lo que simplifica en algunos casos enormemente la construcción del plásmido (Sutton y Broach, 1985).

4.3. Modificaciones en el gen heterólogo.

Otro de los factores a tener en cuenta es el tipo de gen heterólogo que va a ser expresado, así como las características de la proteína que codifica dicho gen.

4.3.1. Uso de cDNA.

En los primeros intentos de producción de proteínas heterólogas además de utilizar el propio promotor del gen que se quería expresar como ya hemos mencionado en un apartado anterior, en el caso de la expresión de la β -globina de conejo (Beggs *et al.*, 1980) se comprobó la imposibilidad por parte de *S. cerevisiae*, de procesar correctamente un DNA compuesto por exones e intrones dando origen a moléculas de RNA aberrantes, no lográndose detectar en ningún momento la proteína. Este hecho indicó la necesidad de trabajar con cDNA cuando se tratase de lograr la expresión de un gen que tuviera intrones en su secuencia.

A nivel de la transcripción de los genes heterólogos se ha observado que regiones ricas en A-T pueden provocar fallos en la transcripción por parada brusca de la misma lo que da origen a proteínas aberrantes o incluso a la ausencia de esa proteína; ello ha llevado a modificar dichas regiones en los genes para lograr una eficiente transcripción de los mismos (Romanos *et al.*, 1991c).

También se debe evitar la presencia de regiones no codificantes en el extremo 5' del gen heterólogo ya que puede dificultarse la iniciación de la traducción al dificultar o distorsionar la unión al ribosoma (Cigan y Donahue, 1987).

4.3.2. Uso de codones. Genes sintéticos.

A nivel de la traducción de genes heterólogos existe controversia acerca de la importancia del uso de codones basada en observaciones contradictorias entre sí. Está claro que los genes más expresados por *S. cerevisiae* presentan unos codones con más frecuencia de uso que otros, son los llamados codones de uso preferencial. Sin embargo, Ernst (1988) describe una serie de genes heterólogos con un alto contenido de codones no preferenciales cuyas proteínas son producidas en gran cantidad. En cambio, hay otros ejemplos en los que el cambio de codones no preferenciales por los más comunes produce un incremento de 50 veces en la cantidad de proteína sin modificar los niveles de RNA (Kotula y Curtis, 1991). Apoyando esta observación se ha

comprobado que los codones de un gen pueden influir en la cantidad de proteína cuando el mRNA está presente en altas cantidades especialmente cuando la expresión se lleva a cabo en medio mínimo donde la célula se ve obligada a producir una amplia variedad de enzimas biosintéticas codificadas por codones no preferenciales (Sharp y Cowe, 1991).

No obstante hay que tener en cuenta que al cambiar los codones en un gen se puede interferir con otros parámetros como son la estructura primaria y secundaria del mRNA que puede afectar a la estabilidad y formación del extremo 3' del RNA (Fleer, 1992).

4.3.3. Adición de secuencia señal. Glicosilación.

Una de las modificaciones que se realiza con más frecuencia en un gen heterólogo es la adición de una secuencia señal, en el caso de que el gen carezca de ella, o la eliminación de su secuencia señal y sustitución por una de *S. cerevisiae*. La adición de esta secuencia señal hace que la proteína sea secretada al medio extracelular. Esto presenta unas indudables ventajas, como la facilidad para la purificación del producto, pero no hay que ignorar los inconvenientes que pueden aparecer, si la proteína heteróloga que se desea producir no es normalmente secretada en su organismo homólogo pueden presentarse problemas de glicosilaciones inespecíficas que pueden alterar su estructura y actividad biológica (Ruohonen *et al.*, 1987 y Romanos *et al.*, 1991c). Incluso en el caso de proteínas que normalmente están glicosiladas *S. cerevisiae* puede realizar una hiperglicosilación de las mismas alterando sus características (Schultz *et al.*, 1987).

Las secuencias señal más utilizadas para lograr la secreción de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae* son las de los genes de factor- α , *MFa1* (Brake, 1989), de la fosfatasa ácida, *PHO5* (Arima *et al.*, 1983 y Sato *et al.*, 1989) y la del gen de la invertasa, *SUC2* (Perlman *et al.*, 1982 y Melnick *et al.*, 1990).

4.4. Estabilidad del vector de expresión.

Además de asegurar un alto nivel de expresión de la proteína cuidando todos los parámetros expuestos anteriormente, el vector de expresión debe ser mantenido de forma estable en la célula.

Los vectores derivados del plásmido de 2 μ son los más utilizados para lograr altos niveles de expresión por el alto número de copias en que están presentes en la célula. Sin embargo, presentan el inconveniente, observado en muchos casos, de la disminución en el número de copias, llegando en ocasiones a la pérdida total del plásmido, originando una ventaja selectiva para las células carentes de plásmido frente a las portadoras del mismo en el cultivo. Esto hace que en la mayoría de los casos la expresión deba llevarse a cabo en medio mínimo para asegurar el mantenimiento del plásmido, lo que significa una menor productividad que cuando se realiza el cultivo en medio rico. Para evitar este problema se han desarrollado sistemas de autoselección para asegurar el mantenimiento del plásmido en las células, independientemente de las condiciones del cultivo, lo que permite trabajar con medios ricos que ofrecen una mayor productividad.

El primer sistema de autoselección se basó en el desarrollo de cepas *ura3 fur1* como receptoras de plásmidos portadores del gen *URA3* (Loison *et al.*, 1986), estas cepas tienen bloqueada la captación de uridina del medio (*fur1*) y la ruta de síntesis interna de uracilo (*ura3*), por lo que el mantenimiento del plásmido *URA3* es esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular. Napp y Dasilva, (1993) han mejorado el sistema añadiendo una tercera mutación *urid-k*, que bloquea la entrada de uridina y citosina. La gran ventaja de este sistema respecto de los que se expondrán a continuación es que es aplicable a todos los plásmidos que contienen *URA3*, marcador muy común en los vectores de expresión de *S. cerevisiae*. Para la obtención de este tipo de cepas se ha desarrollado un sistema basado en la exposición de cepas transformantes a concentraciones 10 mM de 5-fluorouracilo que sólo son toleradas por mutantes *fur1* que aparecen de forma espontánea (Romanos *et al.*, 1991a).

Los otros sistemas desarrollados se basan en el empleo de cepas mutantes condicionales en un gen que está en el vector de expresión con el que se transforma la cepa; ésto obliga al mantenimiento del vector de expresión que porta el gen que complementa la mutación de la cepa hospedadora. Hay descritos dos sistemas de este tipo basado en mutantes termosensibles en el gen *CDC9* que codifica para una DNA ligasa (Unternährer *et al.*, 1991) y otro basado en cepas mutantes en el gen *SRB1*. Los mutantes *srb1* requieren la presencia constante de estabilizador osmótico para asegurar la viabilidad de la cepa, la transformación con un plásmido portador del gen silvestre *SRB1* permite el crecimiento en medio sin estabilización osmótica (Rech *et al.*, 1992).

Recientemente Ludwig *et al.* (1993) han diseñado un sistema basado en la transformación con un plásmido de 2 μ que lleva insertada una cassette de expresión, tras la transformación el plásmido sufre una recombinación mediante la recombinasa F1p con el plásmido endógeno de 2 μ , tras la cual se genera un plásmido que será eliminado por las células quedando la cassette de expresión incorporada en el plásmido endógeno de 2 μ . De esta forma se obtiene un plásmido que es mantenido de forma estable en ausencia de presión selectiva en el medio de cultivo.

Además de los sistemas de autoselección descritos existen otras formas de estabilizar un vector de expresión. Una de ellas se basa en su integración estable en el genoma de *S. cerevisiae*. Para ello se diseñó un sistema que utiliza los elementos delta (δ), que se encuentran dispuestos repetitivamente a lo largo del genoma, de la levadura. De esta forma se han logrado cepas con 20 copias integradas de la cassette de expresión de NGF (factor de crecimiento nervioso) (Sakai *et al.*, 1991). Un sistema similar ha sido desarrollado utilizando los DNA ribosómicos (Lopes *et al.*, 1989, 1990).

No obstante, no todo son ventajas con los sistemas de autoselección, ya que por ejemplo en ellos no se puede prevenir una inestabilidad debida a la aparición de una fuerte presión selectiva en favor de células portadoras de alelos mutantes del gen heterólogo, o con mutaciones en las secuencias del promotor necesarias para lograr un alto nivel de expresión. Este fenómeno fue descrito en una cepa de *S. cerevisiae* transformada con una cassette de expresión de HBsAg (Antígeno de superficie de la hepatitis B) donde se observó que una mutación en el promotor que producía una menor expresión significaba un enriquecimiento del cultivo en las células

portadoras de esa mutación, por la ventaja que adquirirían sobre las que mantenían un mayor nivel de expresión (Fleer, 1992).

5. CEPAS HOSPEDADORAS PARA LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE GENES.

La elección de la cepa cuando se trata de optimizar la expresión de una proteína heteróloga es un factor al que se le ha prestado menor atención en comparación con otros aspectos como el desarrollo de vectores de expresión o el escalado de los procesos. Sin embargo, la importancia del fondo genético de las cepas en la expresión de una proteína heteróloga ha quedado de manifiesto en el estudio de De Baetselier *et al.* (1991), en el que se ensayan varias cepas en relación con la producción de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, encontrándose diferencias de 100 veces en el nivel de expresión entre ellas, sin que exista una explicación aparente para este hecho.

La mejora de las cepas hospedadoras se ha enfocado atendiendo fundamentalmente a dos aspectos:

- mejora de la productividad de la proteína heteróloga
- facilitar la recuperación de la proteína heteróloga.

5.1. Cepas deficientes en proteasas.

La ventaja aportada por este tipo de cepas es la mejora de la productividad por medio de un aumento en la estabilidad de la proteína producida.

5.1.1. Proteasas en *S. cerevisiae* y expresión heteróloga.

S. cerevisiae contiene un gran número de proteasas localizadas en diferentes compartimientos celulares: citosol, vacuola, mitocondria, retículo endoplásmico y aparato de Golgi; así como en las membranas de estos orgánulos celulares (Achstetter y Wolf, 1985). La presencia de algunas de estas proteasas puede interferir con la purificación de enzimas intracelulares así como de proteínas heterólogas (Jones, 1991a). La proteólisis realizada por las proteasas juega un papel central en varios procesos fisiológicos como son la esporulación, situaciones de ayuno de nitrógeno, la secreción de proteínas y la inactivación de feromonas. Tras el uso de *S. cerevisiae* como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas, ha surgido un nuevo enfoque de estas enzimas ya que las proteínas heterólogas parecen ser más susceptibles a los procesos de proteólisis (Enfors, 1992), al tratarse de proteínas extrañas para la célula que las produce. De lo anterior se deduce que la cantidad final de una proteína heteróloga, además de depender de las características del vector, se puede ver afectada por fenómenos de proteólisis en mayor o menor medida según las características de la proteína, su localización subcelular y las características de la cepa hospedadora. Es posible por tanto que una estrategia de defensa de la cepa, para responder a la carga extraña, que representa la hiperproducción de una proteína heteróloga, sea inducir la proteólisis de la misma, además de la pérdida de plásmido o la selección

de mutantes con menor nivel de transcripción. Por todo ello las cepas deficientes en proteasas son cada vez más utilizadas en la expresión heteróloga de proteínas.

La principal fuente de proteólisis inespecífica en la levadura lo representan las proteasas del lumen vacuolar. En extractos celulares de cepas deficientes en esas proteasas se ha observado una disminución de un 95% en la capacidad degradativa de sustratos inespecíficos en comparación con extractos celulares de cepas silvestres (Hirsch *et al.*, 1989). En la vacuola existen varias proteasas: endoproteinasas A y B (yscA/PrA y yscB/PrB), carboxipeptidasas Y y S (yscY/CpY y yscS/CpS), aminopeptidasas I y Co (yscI/ApI y yscCo/ApCo) (Hirsch *et al.*, 1989). Las proteasas más importantes son la PrA y la PrB, siendo la PrA la principal responsable de la maduración del resto de las proteasas vacuolares siguiendo una reacción en cascada de activación junto con la PrB (Jones, 1991b). Las proteasas vacuolares son sintetizadas como precursores inactivos, su maduración se produce catalizada por la PrA y en menor medida por la PrB (Fig. 1). Por otro lado, la PrB ha aparecido como una de las principales fuentes de problemas proteolíticos en la purificación de proteínas homólogas de *S. cerevisiae* (Pringle, 1975).

La PrA está codificada por el gen *PEP4* (Ammener *et al.*, 1986) y la PrB por el gen *PRB1* (Mechler *et al.*, 1988). La mutación en estos genes no produce efectos fenotípicos dañinos para la célula a excepción de que la célula se encuentre sometida a procesos de estrés como esporulación o ayuno de nutrientes.

Las cepas deficientes en PrA (*pep4*) y/o deficientes en PrB (*prb1*) han sido ampliamente utilizadas en la producción de proteínas heterólogas (Tabla II). La justificación del uso de estas cepas en la expresión heteróloga de proteínas es doble, por un lado pueden prevenir una degradación inespecífica de las proteínas durante su proceso de producción, y durante el proceso de rotura celular pueden prevenir la aparición de procesos de proteólisis inespecífica (Titchener-Hooker *et al.*, 1989).

5.2. Cepas supersecretoras y de baja glicosilación.

Aunque la secreción de proteínas es uno de los métodos más empleados en la obtención y recuperación de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*, frecuentemente las cantidades secretadas han sido bajas, probablemente debido al bloqueo de la capacidad de la ruta secretora de la levadura, consecuencia de la elevada cantidad de proteína heteróloga producida por el vector de expresión (Shuster, 1991). Para lograr esta secreción de las proteínas, además de añadir una secuencia señal, se han desarrollado estrategias alternativas basadas en la búsqueda de cepas mutantes supersecretoras.

Sleep *et al.* (1991) desarrollaron un ensayo en placa utilizando anticuerpos de la proteína que se desea secretar, para tras sucesivas rondas de mutagénesis sobre la cepa transformada identificar mutantes supersecretores.

La cepa *pmr1*, deficiente en una ATPasa dependiente de calcio (Rudolph *et al.* 1989), ha demostrado tener una mayor capacidad secretora que la cepa silvestre en el caso de la expresión de hormona bovina de crecimiento (Smith *et al.*, 1985) y prouroquinasa (Turner *et al.*, 1991).

Figura 1. Ruta de maduración de las proteasas vacuolares. La línea superior representa el producto inicial de la traducción; los números, los sitios de corte para originar la proteína madura activa; ps, péptido señal; * proteína activa en catálisis intramolecular; ** proteína con actividad proteolítica en otras moléculas.

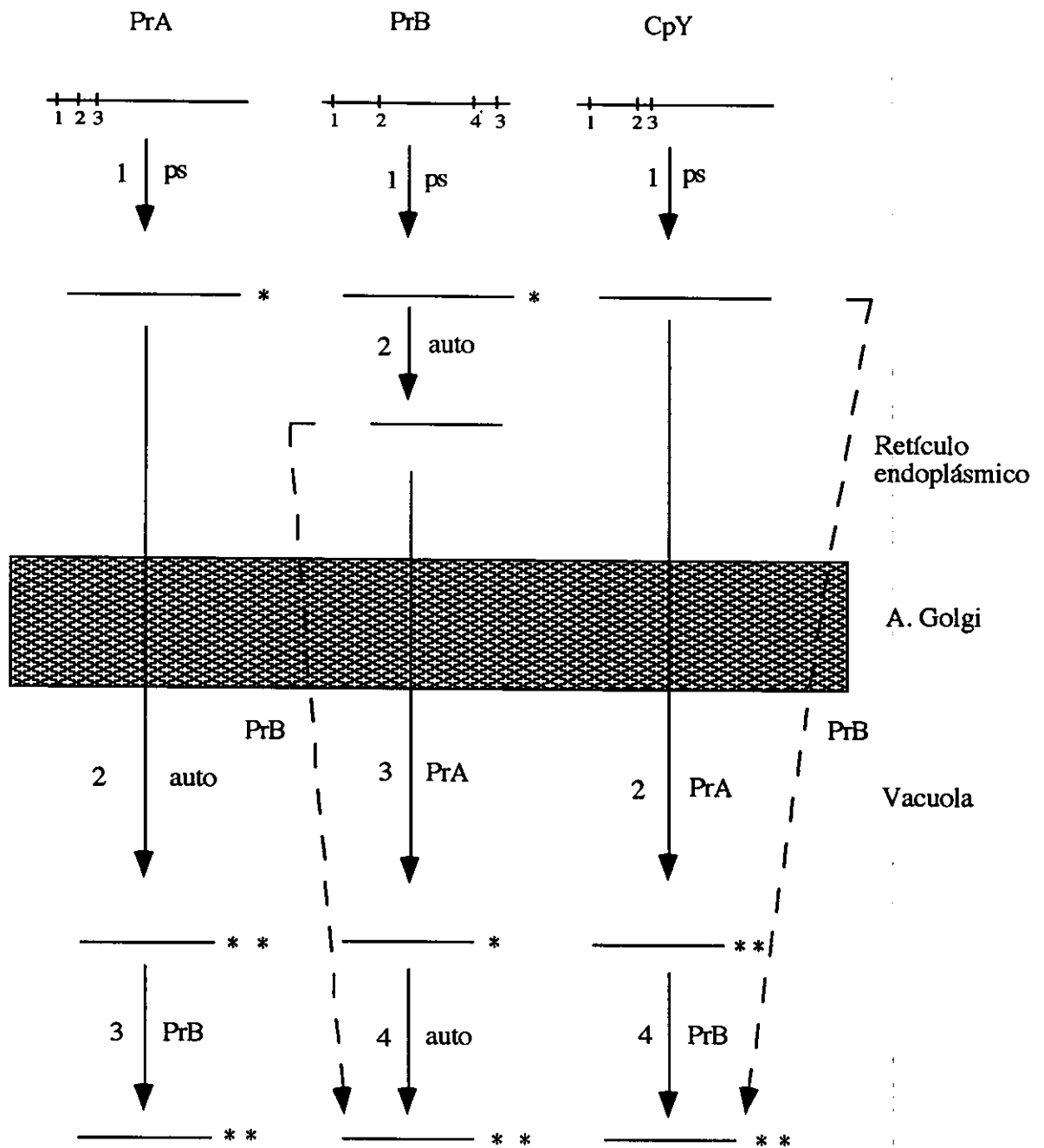


Tabla II. Cepas deficientes en proteasas empleadas en la expresión heteróloga de proteínas en *S. cerevisiae*.

Proteína	Cepa	Genotipo relevante	Referencia
FGFh	AB116	<i>pep4 prb1</i>	Barr <i>et al.</i> , 1988
EGFh	AB103	<i>pep4</i>	Brake <i>et al.</i> , 1984
EGFh	BJ2168	<i>pep4 prb1 prc1</i>	Clements <i>et al.</i> , 1991
tPA	BJ305	<i>pep4 prb1</i>	Gill <i>et al.</i> , 1990
IFN	20B-12	<i>pep4</i>	Hitzeman <i>et al.</i> , 1983
ATPasa	20B-12	<i>pep4</i>	Horowitz <i>et al.</i> , 1990
Quimosina	MT302/1c	<i>pep4</i>	Mellor <i>et al.</i> , 1983
Hemoglobina	GSY-112	<i>pep4 prb1</i>	Wagenbach <i>et al.</i> , 1991
Hirudina	TR1456	<i>prb1</i>	Ibba <i>et al.</i> , 1993
β -galactosidasa	CBL1-20	<i>pep4</i>	Ludwig <i>et al.</i> , 1993
VLPs	BJ2168	<i>pep4 prb1 prc1</i>	Asenjo <i>et al.</i> , 1993

FGFh: factor de crecimiento de fibroblastos humano; EGFh: factor de crecimiento epidérmico humano; tPA: activador tisular de plasminógeno; IFN: interferón; VLP: "virus-like particles" proteína particulada del retrotransposón Ty.

Sin embargo a veces las proteínas secretadas no son activas. Esto puede deberse a fenómenos de hiperglicosilación, especialmente importante en el caso de proteínas que no son naturalmente secretadas llevando a disminuciones de actividad en el caso de la interleukina 1- β (Livi *et al.*, 1991) o a la pérdida de reactividad con anticuerpos en el caso de la proteína gp350 de EBV (Schultz *et al.*, 1987). Por último, pero no por ello menos importante, la glicosilación inespecífica de proteínas heterólogas producidas con fines terapéuticos puede significar su inutilización por la presencia de residuos de α -1,3-manosa que parecen ser inmunogénicos (Ballou, 1970).

En un principio para eliminar los problemas de hiperglicosilación, que con cierta frecuencia ocurren en *S. cerevisiae*, se ideó un sistema basado en mutar las regiones susceptibles de glicosilación de los genes heterólogos que van a ser expresados (Melnick *et al.*, 1990), pero esto suponía un estudio detallado para cada gen y consumía mucho tiempo. Era más efectivo y práctico el uso de mutantes deficientes en glicosilación, especialmente de la síntesis de manano, *mnn9*, que no añadían la cadena externa de manosa (Kukuruzinska *et al.*, 1987). Estos mutantes *mnn9* aún eran capaces de incorporar residuos α -1,3-manosa, por lo que desarrollaron dobles mutantes, tipo *mnn9 mnn1*, en los que se había eliminado por completo la incorporación de restos de manosa durante la glicosilación. Dada la mayor sensibilidad osmótica de dichos mutantes y la disminución en su capacidad de crecimiento, Sledziewski *et al.* (1990) crearon una cepa con la expresión de *MNN9* regulada por temperatura.

Los mutantes *pmr1*, mencionados anteriormente como cepa supersecretora, presentaban también defectos en el patrón de glicosilación, debidos a que dicha mutación evita el paso a través del aparato de Golgi, orgánulo celular en el que se lleva a cabo la hiperglicosilación.

5.3. Cepas que facilitan la liberación de proteínas heterólogas intracelulares.

Cuando las proteínas heterólogas se producen de forma intracelular la recuperación de las mismas requiere la rotura de las células. Por tanto, una alternativa para recuperar el producto producido es el empleo de cepas mutantes que sean capaces de liberar de modo controlado su contenido intracelular al medio de cultivo. Este tipo de mutantes, dentro de los que se encuadra las cepas desarrolladas en nuestro laboratorio, se comentará más adelante.

6. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS INTRACELULARES DE *S. cerevisiae*.

La rotura, desintegración o permeabilización celular es una operación necesaria para el aislamiento de proteínas intracelulares que la célula no es capaz de secretar. Como hemos mencionado anteriormente durante los últimos quince años son numerosos los ejemplos de proteínas heterólogas expresados en *S. cerevisiae*; para muchos de ellos se ha logrado establecer mecanismos de secreción, en cambio para un importante número de ellos no ha sido posible, de ahí la importancia en el desarrollo de técnicas para lograr la recuperación de estas proteínas intracelulares.

El proceso de recuperación de una proteína es previo a su purificación y está integrado por dos procesos:

- la rotura de la célula
- la separación de los restos celulares.

La rotura celular es el primer paso para lograr una correcta liberación del contenido intracelular, existiendo varios métodos para llevarlo a cabo que serán objeto de un tratamiento más detallado a continuación. La separación primaria de los restos celulares se realiza básicamente por centrifugación, siendo necesario además en algunos procesos el uso de técnicas adicionales. Los procesos de purificación son específicos para cada tipo de proteína que se trate de purificar, destacando entre los más utilizados las técnicas cromatográficas (Crueger, 1989).

Por último, no conviene olvidar la influencia del factor económico en el diseño de estos procesos, principalmente en cuanto a consumo de energía, tiempo y trabajo requerido, el cual a su vez está directamente relacionado con el valor añadido de la proteína que se está produciendo.

6.1. Rotura celular de *S. cerevisiae*.

Las células de la levadura *S. cerevisiae* son duras y difíciles de romper, debido principalmente a la existencia de una pared celular gruesa y resistente, formada por sucesivas capas de diferentes polímeros principalmente mananos y β -glucano. A la hora de elegir un método para llevar a cabo una rotura celular, uno de los parámetros a observar es la estabilidad de la proteína que se ha producido y que se va a purificar, ya que la mayoría de las proteínas para mantener su actividad únicamente resisten temperaturas y pH moderados, además representan el blanco ideal para las proteasas liberadas de la célula durante el proceso de rotura celular. Todos estos factores limitan las condiciones del proceso a emplear que deben de ser lo más suaves y cortas posible. Otro aspecto, a la hora de estudiar estos procesos, es la posibilidad de su escalado industrial.

Los métodos de rotura celular, descritos hasta la fecha, para lograr la liberación de proteínas heterólogas intracelulares se dividen en:

- métodos químicos
- métodos físicos
- métodos biológicos.

Las características que debe cumplir el método de rotura ideal son:

- máxima liberación del producto
- impedir la desnaturalización de la proteína o la inactivación de la enzima
- evitar la degradación térmica
- no generar restos celulares de un tamaño de partícula demasiado fino
- ser optimizable y repetitivo.

6.1.1. Métodos químicos.

Se basan en el uso de solventes orgánicos y detergentes para acelerar los procesos de autólisis de *S. cerevisiae* (Breddam y Beenfeldt, 1991). El sistema se basa en la autólisis celular por medio de una plasmolisis originada por tratamiento de las células con solventes orgánicos. Para seguir la liberación del contenido intracelular Breddam y Beenfeldt, (1991) miden la cantidad de la proteasa vacuolar carboxipeptidasa Y liberada por la célula, requiriendo el proceso un fino control del pH en torno a 8. Entre los solventes orgánicos con mejores resultados destacan los alcoholes de cadena entre 6 y 9 carbonos de longitud. Los detergentes con mejores resultados son el Tritón X-100 y N-laurilsarcosina. Desde el punto de vista de su escalado industrial presenta las siguientes ventajas:

- no requiere el uso de aparatos especiales para lograr la rotura celular
- deja unos restos celulares grandes fácilmente separables por simple centrifugación
- el coste de los productos inductores de la autólisis es bajo.

Pero también presenta una serie de inconvenientes como son:

- la dificultad para eliminar los compuestos químicos, utilizados para inducir la autólisis, en posteriores procesos de purificación
- el riesgo de desnaturalización de las proteínas liberadas por parte de los detergentes y los alcoholes empleados en la autólisis
- los largos tiempos de incubación para lograr la autólisis, entre 20 y 30 h
- los problemas que pueden presentar las proteasas liberadas durante el proceso, ya que están muchas horas en contacto con las proteínas liberadas, aumentando el riesgo de su degradación (Breddam y Beenfeldt, 1991).

6.1.2. Métodos físicos.

Estos métodos se basan en la rotura mecánica de las células mediante la aplicación de altas presiones y el uso de homogeneizadores con bolas de vidrio (Schütte y Kula, 1990). Actualmente son los métodos utilizados a nivel industrial, pero presentan el grave inconveniente de la generación de calor, que puede llegar a desnaturalizar la proteína de interés, así como el alto coste de las instalaciones y de los materiales necesarios para la construcción de los aparatos, que debido a las altas presiones que deben soportar son cerámicas especiales o incluso diamantes de uso industrial que encarecen el coste del equipo y su mantenimiento (Schütte y Kula, 1990).

6.1.3. Métodos biológicos.

Estos métodos se basan en la inducción de la autólisis de las células mediante el uso de enzimas líticas, que degradan la pared celular generando protoplastos que son lisados por choque osmótico, o bien empleando cepas que tienen un fenotipo lítico condicional.

6.1.3.1. Uso de enzimas líticos.

Huang *et al.* (1991) han desarrollado un sistema, denominado Liberación Diferencial de Productos (DPR), basado en el uso de enzimas líticos que degradan la pared celular de *S. cerevisiae* combinado con el uso de estabilizadores osmóticos. Con estos tratamientos los autores logran la liberación selectiva de enzimas y proteínas localizados en diferentes compartimientos celulares (espacio periplásmico, citoplasma y mitocondrias). El complejo de enzimas líticos utilizados procede de *Oerskowia xanthinolytica* (Hunter y Asenjo, 1987); obtenido a partir de cultivos continuos de esta especie. Se trata de una mezcla de enzimas líticos con actividades β -1,3-glucanasa, proteasa, β -1,6-glucanasa, mananasa y quitinasa. Todas estas actividades actúan de forma sinérgica en la degradación de la pared celular, pero sólo dos de ellas son esenciales para lograr esta degradación de la pared celular, la actividad mananasa que degrada la capa externa de manano de la pared y la β -1,3-glucanasa para la degradación de la capa interna de glucano (Huang *et al.* 1991). La producción de estas enzimas obtenida en un fermentador de 2000 litros es suficiente para lisar un fermentador de 100.000 litros de *S. cerevisiae* (Schütte y Kula, 1990). También se ha empleado este sistema para lograr la liberación de VLPs del interior de las células (Asenjo *et al.*, 1993).

Actualmente los estudios sobre la Liberación Diferencial de Productos (DPR) se dirigen hacia la selección de las condiciones más suaves para lograr la lisis del cultivo, y por otro lado hacia el abaratamiento de los costes y disponibilidad de las enzimas, que no son reutilizables. Este último aspecto, es uno de los mayores impedimentos para el escalado del proceso, que se vería facilitado si se lograra la clonación de los genes responsables de la producción de las enzimas, para poder acometer su producción en gran cantidad en sistemas celulares más económicos, tipo *E. coli*. Junto a esto, otro problema añadido es la contaminación con proteasas de estos complejos enzimáticos que puede originar la degradación de la proteína de interés y que obliga a realizar técnicas de purificación, durante la obtención de las enzimas líticos, para eliminar las proteasas (Asenjo *et al.*, 1993).

6.1.3.2. Uso de mutantes líticos condicionales.

Las características de los mutantes *srbl* de *S. cerevisiae* (Stateva *et al.*, 1990) han permitido su uso como sistema de liberación de proteínas recombinantes producidas intracelularmente. Estos mutantes únicamente son viables en medios de cultivos estabilizados osmóticamente, de modo que cuando son transferidos a un medio hipotónico las células se lisan. La función del gen *SRBI* es todavía desconocida.

Bröker (1994) aprovechando esta característica estudió la liberación de la proteína heteróloga intracelular Factor XIIIa en estos mutantes, demostrando su liberación tras someter las células a un choque osmótico. Pero solamente el 20% de las células se lisaban permaneciendo resistentes al choque osmótico el resto de la población, lo que indicaba un bajo rendimiento del proceso.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema para liberar de forma controlada proteínas heterólogas intracelulares, basado en el uso de mutantes *slt2* (de la Fuente *et al.*, 1993).

La aplicación biotecnológica de estos mutantes se basa en su fenotipo lítico termosensible. Cuando las células de estos mutantes crecen a 24°C no sufren lisis celular, mientras que a 37°C se lisan liberando el contenido intracelular. La presencia de sorbitol en el medio de cultivo elimina este fenotipo lítico (Torres *et al.*, 1991).

7. GEN *SLT2* DE *S. cerevisiae*.

7.1. Funciones de la pared celular de *S. cerevisiae*.

La pared celular de *S. cerevisiae* puede representar hasta el 30% del peso seco de la célula, luego su mantenimiento representa un gran esfuerzo para la maquinaria celular. Actualmente la pared celular es considerada una estructura celular dinámica sometida a constantes cambios en su arquitectura y composición durante el ciclo biológico de la levadura (gemación, apareamiento, esporulación). Además una de las funciones más obvias e importantes de la pared celular es actuar como soporte estructural de la célula además de proteger a la célula de cambios osmóticos del entorno, así como servir de filtro para la entrada y salida de sustancias de la célula (Klis, 1994).

La protección osmótica es sin duda una de las funciones primarias de la pared celular, sin la presencia de una pared celular estable la célula lisa, a menos que el medio se suplemente con un estabilizador osmótico. Se han descrito varias causas que pueden producir sensibilidad osmótica, algunas de ellas son:

- mutaciones que afectan a la síntesis de β -glucano (Song *et al.*, 1992 y Díaz *et al.*, 1993)
- mutaciones en los genes de una serie de quinasas activadas por una quinasa homóloga de la proteína quinasa C de mamífero (Errede y Levin, 1993).

La permeabilidad de la pared celular, o sea su acción de filtro, determina el paso de moléculas del exterior al interior y viceversa. Se ha demostrado la influencia de factores presentes en el medio de cultivo que pueden afectar a la permeabilidad de la pared estudiando: la liberación de proteínas al medio externo (Rossini *et al.*, 1993) y la penetración de reactivos químicos al interior de la célula (Vogel *et al.*, 1992).

7.2. Pared celular y gen *SLT2*.

Los mutantes autolíticos representan una de las posibles aproximaciones al estudio de fenómenos relacionados con la pared celular.

El mutante autolítico L3, (cedido por el Dr. Cabib), presenta un fenotipo lítico termosensible a 37°C y eliminable por estabilización osmótica del medio de cultivo; esta observación permitía relacionar la mutación de L3, denominada inicialmente *lyt2-1*, con la formación de una pared celular osmóticamente estable a la temperatura de 37°C. Por complementación del fenotipo de este mutante L3, se clonó en nuestro laboratorio el gen *SLT2* (Torres *et al.*, 1991). Dicho gen codifica para una proteína serín-treonín quinasa, siendo la primera quinasa relacionada con el mantenimiento de una pared celular estable. Más tarde Lee *et al.* (1993) clonaron el gen *MPK1* que codificaba una MAP quinasa perteneciente a una ruta de

transmisión de señales mediada por la proteína quinasa C, resultando dicho gen ser idéntico a *SLT2*. Esta ruta de transmisión de señales se ha relacionado con el control de la síntesis y mantenimiento de la pared celular, sin que se tengan evidencias claras de los efectores finales de la ruta. Recientemente Davenport *et al.* (1994) han postulado la activación de la ruta como una respuesta a un estrés hipotónico en el medio externo, ya que en esas condiciones detectan un aumento en la fosforilación de la proteína Slt2p.

Aunque inicialmente se pensó que los genes *SLT2* y *LYT2* no eran alélicos, la recuperación del alelo *SLT2* en los mutantes *lyt2* demostró que este alelo estaba afectado en dichos mutantes, concretamente existía una sustitución de la Gly35 por un Asp. La mutación *lyt2-1* se renombró *slt2D35*, nuestros mutantes inicialmente denominados *lyt2-1* han pasado a denominarse *slt2D35*.

Los otros componentes de la ruta son: *PKC1* (Levin y Bartlett-Heubusch, 1992), *BCK1* (Lee y Levin, 1992) y *MKK1/MKK2* (Irie *et al.*, 1993) (Fig. 2). El orden de los componentes de la ruta se ha realizado mediante experimentos de epistasis (Avery y Wasserman, 1992). La actividad de la MAP quinasa Slt2p es requerida para el mantenimiento de una pared celular osmóticamente estable a la temperatura de 37°C (Martín *et al.*, 1993), al igual que el resto de componentes de la ruta en los que la interrupción de los genes causa un fenotipo lítico eliminado por estabilización osmótica del medio de cultivo a 37°C, excepto en el caso de *PKC1*, donde los mutantes *pkc1Δ* requieren estabilización osmótica a cualquier temperatura para ser viables (Paravicinin *et al.*, 1992), lo que sugiere una bifurcación de la ruta a ese nivel. La existencia de esta ruta de transmisión de señales reafirma la idea de la pared celular como una estructura dinámica a lo largo del ciclo celular, sometida en todo momento a una fina regulación por parte de la célula, y la esencialidad de una pared celular osmóticamente estable para asegurar la viabilidad de las células.

En la levadura se han descrito otras rutas de transmisión de señales en las que participan MAP quinasas (Johnson y Vaillancourt, 1994) relacionadas con los procesos de apareamiento celular y regulación osmótica de la célula. La comparación entre los diferentes elementos de estas rutas permite afirmar la existencia de un módulo de transmisión de señales integrado por MAP quinasas conservado a lo largo de la evolución ya que las rutas descritas en vertebrados son similares a las descritas en *S. cerevisiae*. Así por ejemplo una MAP quinasa de *Xenopus laevis* sobreexpresada en un mutante *slt2* de *S. cerevisiae* restaura su capacidad de crecimiento a 37°C. Así pues estas observaciones abren un amplio campo para el empleo de *S. cerevisiae* como modelo de estudio de la transmisión de señales mediadas por rutas de las que forman parte MAP quinasas.

7.3. Otras características del fenotipo *slt2*.

Los mutantes *slt2* además del fenotipo lítico característico presentan otras características fenotípicas destacables:

- alta sensibilidad a cafeína, concentraciones 12 mM de esta sustancia producen lisis de las células a 24°C, la lisis de nuevo es eliminada por la adición de un estabilizador osmótico al medio de cultivo

Figura 2. Ruta de transmisión de señales en *S. cerevisiae* implicada en el mantenimiento de la integridad celular, a través de la formación de una pared celular osmóticamente estable.

(Estrés Hipotónico)



Pkc1p



Bck1p



Mkk1p/Mkk2p



Slr2p



Formación pared celular estable

- incapacidad para crecer en glicerol como única fuente de carbono a la temperatura de 30°C
- elevada sensibilidad a inhibidores de la síntesis de la pared celular.

8. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS DE INTERÉS EN *S. cerevisiae*.

A continuación se comentan los tres tipos de proteínas heterólogas producidas en la levadura *S. cerevisiae* en este trabajo.

8.1. Cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

La enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT), de origen bacteriano, es responsable de la resistencia a cloranfenicol en cepas de *E. coli* (Shaw, 1983). Su expresión en *S. cerevisiae* fue desarrollada para lograr un sistema de transformación basado en el empleo de un marcador dominante que permitiera tanto la transformación de cepas industriales como de laboratorio basándose en la resistencia a cloranfenicol que confería dicho gen, ya que este antibiótico es tóxico para los ribosomas mitocondriales (Hadfield *et al.*, 1986). En un trabajo posterior Hadfield *et al.* (1987) comparan la expresión de CAT en *S. cerevisiae* y *E. coli* demostrando la producción de una proteína idéntica, que en la levadura se producía en un nivel que representaba el 2.1% de la proteína total.

Este alto nivel de expresión y el hecho de que fuera de producción intracelular así como la fácil detección de la misma por medio de un ensayo espectrofotométrico (Shaw, 1975), nos llevó a elegirla como proteína heteróloga modelo para estudiar la liberación de proteínas heterólogas intracelulares en mutantes autolíticos.

8.2. Expresión de la proteína HLA-DP de clase II en *S. cerevisiae*.

Los genes DP del sistema de histocompatibilidad humano codifican para unas proteínas que se encuadran en los denominados antígenos de clase II (Benacerraff, 1991). Se expresan en la superficie de diferentes tipos de células implicadas en la respuesta inmunitaria (linfocitos B, linfocitos T activados, macrófagos etc.) siendo su función la de presentar péptidos antigénicos. Éstos proceden de la degradación de antígenos captados del exterior celular (proteínas exógenas) llevada a cabo por las células presentadoras de antígeno. El conjunto HLA-claseII/péptido es reconocido por las células T cooperadoras (Unanue y Allen, 1987).

A diferencia de las proteínas de clase I, purificadas y cristalizadas por Garret *et al.* (1989), las de clase II, tipo DP, no han sido purificadas lo que justifica su expresión en un sistema heterólogo con este fin. Existen ejemplos previos de éxito de la producción en *S. cerevisiae* de proteínas complejas que requieren ensamblaje: Horwitz *et al.* (1988) logran la secreción de un anticuerpo, Wagenbach *et al.* (1991) demuestran el ensamblaje de las dos cadenas de la hemoglobina de conejo y Jansen *et al.* (1989) obtienen el ensamblaje de las diferentes subunidades del receptor nicotínico de *Torpedo californica*. Además Stern y Wiley (1992),

producen con éxito unas formas solubles del alelo DR de clase II del MHC usando como sistema de expresión baculovirus.

8.3. Expresión de Ty-VLPs de *S. cerevisiae*.

La proteína Ty-VLP es una proteína multimérica producto de la sobreexpresión del retrotransposón de la levadura Ty (Kingsman *et al.*, 1991). El retrotransposón Ty de *S. cerevisiae* presenta una organización similar a la de un retrovirus excepto la presencia de proteínas de la envoltura, ya que su replicación es intracelular. El nombre VLP (Virus Like Particles) se debe a que sus proteínas se ensamblan asemejando un "core" retroviral, formado por 300 subunidades con un diámetro de 60 nm.

Adams *et al.* (1987) demostraron que únicamente la sobreexpresión de uno de los genes del retrotransposón, concretamente el gen *TYA*, era suficiente para la formación de las partículas, que se acumulaban en un alto número dentro de la célula. El producto del gen *TYA* es la proteína p1.

La producción de estas partículas ha demostrado tener varias aplicaciones basadas en las diferentes características que presenta:

- se han utilizado como vehículos de presentación antigénica, mediante el desarrollo de proteínas de fusión con la proteína p1. La ausencia de envuelta glicoproteica de estas partículas les confiere un carácter no inmunogénico lo que permite el uso de estas proteínas de fusión para obtener anticuerpos y desarrollar vacunas. Entre las proteínas de fusión realizadas destacan la obtenida con una proteína antigénica del virus VIH (Griffiths *et al.*, 1991).
- también es posible utilizarlo como un sistema de purificación, aprovechando las características físicas de las partículas que permite separarlas del resto mediante centrifugación en gradientes de sacarosa (Adams *et al.*, 1987).

9.LEVADURAS NO CONVENCIONALES.

En los últimos años han comenzado a utilizarse otras especies de levadura como hospedadores para la expresión heteróloga de proteínas. Esto se debe a la aparición de problemas en la expresión de ciertas proteínas en *S. cerevisiae*, bajos niveles de secreción y productividad, e incluso fracasos completos en la expresión de un gen (Romanos *et al.*, 1992).

Por todo ello se inició el estudio de especies de levadura que pudieran evitar esos problemas. Se recurrió a especies de levadura que eran empleadas en diferentes procesos industriales: *Pichia pastoris*, empleada en la producción de "single-cell protein" a gran escala crecida en medios con metanol, ya que se trata de una levadura metiltrófica (Wegner, 1983); *Kluyveromyces lactis* de uso tradicional en la industria alimentaria para la producción de lactasa; *Yarrowia lipolytica*, usada en la producción de metabolitos como el ácido cítrico (Shah *et al.*, 1982) y *Hansenula polymorpha* que es otra levadura metiltrófica. En todas ellas se contaba ya

con un conocimiento previo acerca de técnicas para su cultivo en gran escala en medios de cultivo muy económicos.

De todas ellas *P. pastoris* y *H. polymorpha* han demostrado tener las mejores características para ser desarrolladas como hospedadores para la expresión heteróloga debido a su capacidad para crecer en presencia de metanol, característica que ha sido aprovechada para desarrollar un sistema de promotores inducibles por metanol.

9.1. Expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*.

P. pastoris es una especie de levadura metiltrófica ampliamente utilizada en fermentaciones industriales con un ciclo biológico y unas características parecidas a *S. cerevisiae* (Gleeson y Sudbery, 1988). La similitud con *S. cerevisiae* se pone de manifiesto por la funcionalidad cruzada de genes entre ambas especies, ha permitido utilizar marcadores auxotróficos de *S. cerevisiae* para la selección de transformantes de *P. pastoris*. Para poder desarrollar esta levadura como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas se requería un sistema de transformación, que fue desarrollado por Cregg *et al.* (1985), y la existencia de promotores fuertes. Concretamente Ellis *et al.* (1985) clonaron los genes de la ruta de asimilación de metanol; entre estos genes se eligió el promotor del gen *AOX1* (Alcohol oxidasa 1) para utilizarlo en la expresión heteróloga, siendo una de los promotores más fuertes descritos en la naturaleza, ya que llega a acumular el 30% de la proteína total creciendo en metanol. La ausencia de plásmidos nativos en esta especie de levadura obligó al desarrollo de unos vectores de expresión que produjeran la integración de la cassette de expresión, vía recombinación homóloga, en el genoma de la levadura.

P. pastoris ha demostrado ser un hospedador excelente tanto para la producción de proteínas heterólogas a nivel intracelular como por secreción. En este último aspecto es de destacar que presenta un patrón de glicosilación más parecido a las células eucariotas superiores ya que no añade la ramificación final de manosa que añade *S. cerevisiae*, con lo que las proteínas producidas corren menor riesgo de ver alteradas sus características inmunogénicas y su actividad biológica (Cregg *et al.*, 1993). En la tabla III se citan ejemplos de proteínas que han sido producidas en *P. pastoris*, observándose la presencia de proteínas de muy variadas características.

También se han desarrollado cepas de *P. pastoris* que presentan una mayor estabilidad en las proteínas heterólogas producidas en este sistema. Gleeson y Howard, (1991) han desarrollado una cepa de *P. pastoris* mutada en el gen *PEP4* de esta levadura, lo que hace que dicha cepa sea deficiente en proteasas vacuolares.

Para el crecimiento de esta levadura a altas densidades ópticas, se ha desarrollado un sistema de fermentación alimentada ("fed-batch") con una fase inicial de crecimiento en glicerol para obtener biomasa, ya que en estas condiciones el promotor del gen *AOX1* está reprimido, y a continuación la fase de inducción, con adición de metanol que dura unas 50 horas (Cregg *et al.*, 1993).

Tabla III. Ejemplos de proteínas heterólogas expresadas en *P. pastoris*.

Proteína	Expresión	Referencia
β -galactosidasa	Intracelular	Tschopp <i>et al.</i> , 1987a
Antígeno superficie virus hepatitis B	Intracelular	Cregg <i>et al.</i> , 1987
Factor de necrosis tumoral (TNF)	Intracelular	Sreekrishna <i>et al.</i> , 1988
Fragmento C de la toxina tetánica	Intracelular	Clare <i>et al.</i> , 1991a
Antígeno P69 de Pertussis	Intracelular	Romanos <i>et al.</i> , 1991
Estreptoquinasa	Intracelular	Hagenson <i>et al.</i> , 1989
Invertasa	Secreción	Tschopp <i>et al.</i> , 1987b
Albúmina sérica humana	Secreción	Barr <i>et al.</i> , 1992
Lisozima bovina	Secreción	Digan <i>et al.</i> , 1989
Factor crecimiento epidérmico humano (EGFh)	Secreción	Cregg <i>et al.</i> , 1993
Aprotinina	Secreción	Vedvick <i>et al.</i> , 1991
Factor de crecimiento epidérmico ratón (EGFm)	Secreción	Clare <i>et al.</i> , 1991b

En resumen, la levadura *P. pastoris* ha alcanzado un uso extenso como hospedador en la expresión heteróloga de proteínas, desplazando en algunos casos a *S. cerevisiae* como sistema de elección, debido a su mayor productividad, mejor capacidad secretora y patrón de glicosilación, disponibilidad de un sistema de crecimiento a gran escala y disponibilidad de un sistema de inducción de la expresión fuerte y finamente regulado.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS Y PLÁSMIDOS UTILIZADOS.

1.1. Cepas de *S. cerevisiae*.

Las cepas utilizadas en este trabajo, su genotipo, así como su procedencia, se detallan en la tabla IV.

1.2. Cepas de *E. coli*.

Únicamente se utilizó la cepa DH5 α (*recA*, *endA1*, *gyr96*, *thi1*, *hsdR 17*, *supE44*, (*rk*, *mk*⁺), *relA1*, *F80R*, *lacZM15*, *F Φ 80^R*, *relA1*⁻).

1.3. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla V.

2. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo se esterilizaban en autoclave a 121°C durante 20 minutos o bien mediante filtración. Para lograr la solidificación del medio, se añadía bacto-agar a una concentración final de 20 g/l.

2.1. Medios de cultivo para *E. coli*.

Medio LB, como medio rico para el crecimiento bacteriano (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l).

Medio TB, empleado en la realización de minipreparaciones de DNA a partir de transformantes de *E. coli* (bacto-triptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, glicerina 4ml/l, adicionándose tras su esterilización KH₂PO₄ 2.3 g/l y K₂HPO₄ 12.5 g/l).

Medio SOB, utilizado en el crecimiento de las bacterias en experimentos de transformación por el método de Hanahan, (1985) (bacto-triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10mM, adicionándose tras su esterilización KCl y MgCl₂ hasta una concentración 2.5 mM y 10 mM respectivamente).

Medio SOC, empleado para expresar la resistencia al antibiótico en experimentos de transformación por el método de Hanahan, (1985) (medio SOB al cual se le adicionaba una solución estéril de glucosa 2 M, hasta una concentración final de 20 mM).

A estos medios se les añadía:

- Ampicilina (100 μ g), para seleccionar células resistentes a dicho antibiótico.
- X-Gal en dimetilformamida e IPTG en agua (40 μ l por placa de Petri de ambas soluciones, de concentración 40 mg/ml y 1 M respectivamente) para discriminar los clones

Tabla IV.. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia Procedencia
TD28	<i>MATa, ura3Δ52, inos 1-151, can^R</i>	Dr. F. del Rey Dept. Microbiología Univ. Salamanca
DBY-746	<i>MATα, trp1-289, leu2-3.112, ura3Δ52, his3Δ1</i>	Dr. F. del Rey Dept. Microbiología Univ. Salamanca
L3c34a	<i>MATα, slt2D35, leu2-3.112, ade2, his4Δ34</i>	Dept. Microbiología II F. Farmacia Univ. Complutense
L3c46c	<i>MATa, slt2D35, leu2-3.112, ura3Δ52, his4Δ34</i>	Dept. Microbiología II F. Farmacia Univ. Complutense
LD1	<i>MATa/MATα, slt2D35/slt2D35, leu2-3.112/leu2-3.112, his4Δ34/his4Δ34</i>	Dept. Microbiología II F. Farmacia Univ. Complutense
LHDP1	<i>MATa, slt2D35, ade2, leu2-3.112, pep4ΔHIS3, prb1Δ1.6R</i>	Este trabajo
LHDP2	<i>MATα, slt2D35, ade2, leu2-3.112, pep4ΔHIS3</i>	Este trabajo
LHDP3	<i>MATα, slt2D35, ade2, leu2-3.112, trp1-289, ura3Δ52, pep4ΔHIS3</i>	Este trabajo
BJ5461	<i>MATa, ura3Δ52, trp1-289, lys2-801, leu2-3.112, his3Δ200, pep4ΔHIS3, prb1Δ1.6R can1 GAL</i>	Yeast Genetic Stock Center Univ. California Berkeley
BJ5464	<i>MATα, ura3Δ52, trp1-289, leu2-3.112, his3Δ200, pep4ΔHIS3, prb1Δ1.6R can1 GAL</i>	Yeast Genetic Stock Center Univ. California Berkeley
LDKP1	<i>MATα, slt2ΔURA3, ura3Δ52, trp1-289, leu2-3.112, his3Δ200, pep4ΔHIS3, prb1Δ1.6R can1 GAL</i>	Este trabajo

Tabla V. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Características	Tipo	Referencia Procedencia
YEp 352	ori 2μ bla lacZ (MCS) URA3	Vector bifuncional <i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> Episómico	Hill <i>et al.</i> , 1986
pCH100L	ori 2μ bla <i>LEU2 TRP1</i> ADC1p-CAT-CYC1t	Vector de expresión de CAT en <i>S. cerevisiae</i> Episómico	C. Viñambres Dept. Microbiología II F. Farmacia UCM
pMA5620	ori 2μ bla <i>LEU2-d</i> PGKp-TYAd-PGKt	Vector de expresión VLP en <i>S. cerevisiae</i> Episómico	Adams <i>et al.</i> , 1987
pCH98	ori 2μ bla <i>TRP1</i> ADC1p- CYCt	Vector con cassette de expresión ADC1 Episómico	Hadfield <i>et al.</i> , 1986
pMA91	ori 2μ bla <i>LEU2-d</i> PGKp-PGKt	Vector con cassette de expresión PGK Episómico	Mellor <i>et al.</i> , 1983
RSV5.gpt	ori bla LTRp gpt	Vector bifuncional <i>E. coli</i> /líneas celulares Resistencia á. micofenólico	Long <i>et al.</i> , 1991
RSV5.neo	ori bla LTRp neo	Vector bifuncional <i>E. coli</i> /líneas celulares Resistencia G418	Long <i>et al.</i> , 1991

portadores del gen de la β -galactosidasa, frente a los que habían adquirido inserto, en los experimentos de clonación.

2.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

Medio YPD, medio rico de crecimiento (medio YED al cual se le adicionaban 20 g/l de peptona).

Medio MM, medio sintético utilizado generalmente para seleccionar y mantener los transformantes de levadura o para determinar las auxotroffas de una determinada cepa (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos 6.7 g/l, glucosa 20 g/l más, esterilizados por separado, las bases o aminoácidos proteinógenos de elección, según las necesidades, a una concentración de 30 mg/ml).

Medio MPE, como medio sólido muy rico utilizado para el crecimiento de diploides para una inducción posterior de su esporulación (extracto de levadura 8 g/l, peptona 3 g/l, glucosa 100 g/l).

Medio ME, medio sólido inductor de la esporulación de cepas diploides (acetato potásico 10 g/l, extracto de levadura 1 g/l, glucosa 0.5 g/l).

Medio MR, medio de regeneración de protoplastos, empleado en experimentos de transformación según Hinnen et. al. (1978). Se caracteriza por su elevada concentración en sorbitol para crear un ambiente isotónico capaz de permitir la regeneración de los protoplastos, conteniendo además todos los requerimientos nutricionales necesarios para la regeneración de la pared celular, excepto el marcador de selección del plásmido (sorbitol 182.4 g/l, glucosa 20 g/l, agar 30 g/l, YPD líquido 10 ml/l, solución aminoácidos 140 ml/l). La solución de aminoácidos se prepara según Sherman *et al.* (1986). El medio YEPD y la solución de aminoácidos se añaden atemperados a 50°C al medio recién esterilizado, una vez atemperado a dicha temperatura.

Los medios empleados en las fermentaciones alimentadas se detallan en la tabla VI.

Cuando era necesario los medios podían ser suplementados con estabilizadores osmóticos, cafeína, BCIP:

- cafeína, se preparaba una solución madre 825 mM en agua estéril, añadiéndose la cantidad necesaria al medio, generalmente 12 mM, antes de repartirse en las placas de Petri vacías.

- sorbitol, se añadía al preparar el medio de cultivo esterilizándose en autoclave conjuntamente, se empleaba en concentraciones 1 M (182.4 g/l), 0.5 M (91.2 g/l), 0.25 M (45.6 g/l).

- cloruro sódico (NaCl) al 1.5%, empleado como estabilizador osmótico.

- BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato), se añade la solución acuosa de la sal disódica filtrada al medio de cultivo atemperado a 50°C, antes de que se solidifique el agar, a la concentración final de 40 μ g/ml.

Tabla VI. Composición de los medios de cultivo empleados en las fermentaciones alimentadas.

Componente	Medio sintético		Medio rico	
	Inicial	Alimentación	Inicial	Alimentación
Glucosa (g/l)	2	533	2	533
Extracto de levadura (g/l)	-	-	40	30
Aminoácidos (g/l)	5	25	-	-
KH ₂ PO ₄ (g/l)	13.5	2.9	13.5	2.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	1	50	3.8	5
MgSO ₄ 7H ₂ O (g/l)	1	3.8	1	3.8
Tiamina (g/l)	0.004	0.01	0.004	0.01
Inositol (g/l)	0.02	0.07	0.02	0.07
Solución metales ^a (ml)	3	7	3	7
Solución vitaminas ^b (ml)	3	7	3	7
Antiespumante (ml/l)	1.5	1.5	1.5	1.5

a) Solución de metales: ZnCl₂ 4H₂O, 2 g/l; MgMoO₄ 2H₂O, 2 g/l; H₃BO₃, 0.5 g/l; HCl conc., 100ml/l.

b) Solución de vitaminas: ácido pantoténico, 0.42 g/l; niacina, 3.05 g/l; piridoxina, 0.7 g/l; biotina, 0.003 g/l; ácido fólico, 0.02 g/l.

3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

3.1. Condiciones de crecimiento y conservación de cepas.

3.1.1. Cepas de *E. coli*.

Estas cepas se conservaban a -20°C en viales con glicerol al 50%. El cultivo en medio líquido se realizaba a 37°C y agitación vigorosa durante el tiempo necesario. El cultivo en medio sólido generalmente era en placa y se incubaba a igual temperatura durante 16-20 horas.

3.1.2. Cepas de *S. cerevisiae*.

Las estirpes utilizadas se conservaban a 4°C en tubos con medio sólido inclinado YPD, que contenía doble concentración de todos los nutrientes, o bien congeladas a -20°C, en alícuotas líquidas que contenían glicerol a una concentración final del 20%. Las estirpes transformadas, se solían conservar temporalmente en placas o en tubos con el medio MM sólido adecuado. Se realizaban resiembras periódicas de las cepas mantenidas en tubo inclinado cada 6 meses.

El crecimiento en medio sólido se llevaba a cabo generalmente en placas de Petri, a la temperatura elegida (24-37°C) durante el tiempo necesario.

Para los cultivos líquidos se utilizaban matraces, de capacidad 5 veces superior al volumen del medio, incubándose en un baño con agitación a la temperatura adecuada.

3.1.2.1. Crecimiento en fermentador.

El fermentador empleado fue el modelo Braun Biostat E, tanto para realizar las fermentaciones discontinuas como para las de tipo alimentado.

3.1.2.1.1. Cultivos discontinuos.

El volumen de trabajo fue de 10 l, la aireación 2 l/min, la agitación de 250 rpm. El medio utilizado era YPD, la temperatura era 24° o 37°C dependiendo del tipo de experimento.

3.1.2.1.2. Cultivo alimentado.

La fermentación alimentada se realizaba controlando el cociente respiratorio del cultivo como parámetro para regular la adición de medio fresco (Fieschko *et al.*, 1987). En un principio, la fermentación se iniciaba como un cultivo discontinuo, cuando se agotaban los nutrientes se iniciaba la adición de medio de cultivo comenzando la fermentación alimentada. Las condiciones de trabajo eran: volumen inicial de trabajo 15 l (sobre una cuba de 25 l), pH fijo en 4.5, aireación inicial 5 l/min, pO₂ fijada en 50% controlada por la agitación (inicial 250 rpm) y la aireación, que incrementaban sus valores conforme la demanda de oxígeno era mayor en el cultivo aumentando

el caudal de aire, así como la velocidad de agitación para lograr una eficiente disolución del mismo.

Los medios de cultivo fueron medio sintético y medio complejo, la composición de los medios se refleja en la tabla VI.

3.2. Determinación del crecimiento.

3.2.1. Turbidimetría.

El crecimiento de los cultivos se determinaba mediante la medida de la turbidez del mismo, por lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DV 640. Las muestras se diluían convenientemente hasta que su DO se encontrara en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de DO y el número de células (0.05-0.4).

3.2.2. Recuento de células.

La determinación de la concentración celular de *S. cerevisiae* en el medio de cultivo se realizó con una cámara Neubauer cuentaglóbulos, por observación directa en un microscopio de contraste de fases. Para que la muestra fuera estadísticamente significativa, el número de células contadas por cámara debía ser superior a 300.

3.2.3. Cálculo de biomasa.

En fermentaciones a gran escala, la medida del crecimiento se realiza por determinación de la biomasa como peso seco de células por litro de cultivo. En este trabajo se ha empleado para medir el crecimiento en las fermentaciones alimentadas. Se toman los tubos eppendorf, se secan en un horno a 100°C durante 2 h, se pesan y se guardan en presencia de sílice, se añade 1 ml de cultivo, se centrifuga eliminándose el sobrenadante, se secan de nuevo en horno 5-10 h, al cabo de ese tiempo se vuelven a pesar calculándose la diferencia que corresponde al peso seco de las células. Cada medida se realiza por triplicado, obteniéndose la media aritmética como valor definitivo expresado en g/l.

3.3. Determinación del número de viables.

3.3.1. Por citometría de flujo.

Se llevó a cabo mediante la tinción selectiva de las células con yoduro de propidio, según el método descrito por de la Fuente *et al.*, (1992), utilizando un analizador del Centro de Citometría de Flujo de la UCM marca Becton-Dickinson, Sunnyvalley, CA, modelo FACScan. Para el análisis de datos se utilizaron los programas de Becton-Dickinson (San José, CA), FACScan Research Software y LYSYS II.

3.4. Técnicas de microscopía.

3.4.1. Microscopía de contraste de fases.

Las muestras de levaduras se observaban en montaje húmedo, en un microscopio Nikon Optiphot, empleando un objetivo de contraste de fases 40 X y un ocular 10 X. Cuando se usaba el yoduro de propidio como fluorocromo indicador de muerte celular, se utilizaba la iluminación de fluorescencia.

3.5. Técnicas genéticas.

3.5.1. Obtención de diploides.

Se utilizó la técnica descrita por Fink (1971). El aislamiento de los diploides se llevaba a cabo mediante micromanipulación, utilizando un micromanipulador Leitz acoplado a un microscopio Wild de contraste de fases, sobre láminas de medio sólido de preesporulación (MPE). Posteriormente, éstas eran incubadas en placas con agar agua (a fin de proporcionar la humedad necesaria) a 24°C durante 3-4 días, tiempo tras el cual las colonias de los diploides se hacían visibles.

3.5.2. Esporulación.

Cuando se requería la esporulación de algún diploide, éste se sembraba primero en medio de preesporulación y se dejaba crecer durante 3 o 4 días a 24° o 28°C, según las características de la cepa. Pasado este tiempo, se sembraba en medio de esporulación a 24° C y se incubaba durante un tiempo que oscilaba entre 5 y 14 días. La presencia de ascas se ponía de manifiesto por observación microscópica.

3.5.3. Disección de ascas.

La disección de ascas se realizaba con arreglo al método descrito por Johnston y Mortimer (1959), modificado por Bevan y Costello (1964), excepto en la utilización de glusulasa (Endo Laboratories inc, Wilmington, Delaware, USA) a una concentración del 10% durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 minutos. En estos trabajos se utilizaba el micromanipulador previamente citado.

3.5.4. Ensayos genéticos en placa de mutaciones en los genes de proteasas.

Las actividades proteasa son susceptibles de ensayos en placa (Jones, 1991a). Se basan en la permeabilización de las células para permitir el contacto de las proteasas con su sustrato que se traduce en un cambio de color o en la aparición de un halo en la colonia.

3.5.4.1. Ensayo de actividad proteasa A, test APE.

La permeabilización de las células se logra con una sobrecapa de dimetilformamida en la que se disuelve el éster de β -naftil N-acetil-DL-fenilalanina, éste es hidrolizado por la proteasa A produciendo β -naftol que reacciona con una solución de la sal de diazonio Fast Garnet GBC apareciendo la colonia de color rojo si hay actividad proteasa o de color rosa si la colonia está mutada en ese gen careciendo de actividad proteasa A (Jones, 1991a).

3.5.4.2. Ensayo de actividad proteasa B, test HPA.

La permeabilización de las células se logra con una sobrecapa conteniendo SDS, la proteasa B es capaz de hidrolizar el sustrato particulado Hide Powder Azure apareciendo un halo alrededor de la colonia (Jones, 1991a).

4. MANIPULACIÓN DE DNA. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

4.1. Soluciones tampón utilizados.

Todos los tampones empleados en este apartado están descritos en el manual de laboratorio de Sambrook *et al.*, (1989).

4.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para la extracción de DNA plasmídico de *E. coli*, se utilizaron fundamentalmente dos métodos. Así, mediante el método descrito por Holmes y Quigley (1981), por ebullición de las células en presencia de lisozima, se obtenía DNA de forma rápida y en pequeña escala, en general utilizado para el análisis de clones de transformación. Para la obtención de DNA en mayor cantidad y de mayor pureza se siguió el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989), excepto en las precipitaciones, las cuales se realizaron con isopropanol. Asimismo, se llevaba a cabo una purificación mediante solubilización con acetato amónico 2.5 M y posterior precipitación con isopropanol.

4.3. Aislamiento de DNA y RNA total de células de levadura.

Para la obtención de DNA total de *S. cerevisiae* y de *P. pastoris*, y de RNA de *S. cerevisiae* se siguieron básicamente los métodos descritos por Sherman *et al.*, (1986).

4.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La preparación de los geles de agarosa y las muestras, así como el desarrollo de la electroforesis, se llevó a cabo según las técnicas descritas por Davis *et al.*, (1986). La concentración usual de agarosa en los geles era del 0.7%, preparándose éstos en tampón TAE y adicionando bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. La electroforesis se realizó en cubetas Bio-Rad wide minisubcell, Bio-Rad subcell y BRL H6. Las bandas de DNA se

visualizaban con un transiluminador de luz UV a 254 nm, fotografiándose con una cámara Polaroid con película polaroid 667 y filtro rojo Kenko R1 o bien se utilizó un scanner Gelprinter (Vicon industries inc. Melville, NY, USA).

4.5. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa.

Para llevar a cabo el aislamiento de determinados fragmentos de DNA de geles de agarosa se siguió el procedimiento general de electroelución recogido por Sambrook *et al.*, (1989), si bien se omitía el pretratamiento del papel (Whatman DE 81) con EDTA y NaOH; los lavados con el tampón "Low salt" se llevaban a cabo en un tubo eppendorff y las eluciones con el tampón "High salt" eran realizadas a temperatura ambiente. Un segundo método utilizado se basa en la adsorción a polvo de vidrio, utilizando el kit GeneClean, de acuerdo con las directrices de la casa comercial (BIO 101, La Jolla, California).

4.6. Determinación del tamaño, pureza y concentración de DNA.

La determinación del tamaño de los fragmentos lineales de DNA se llevó a cabo utilizando como patrones los diversos marcadores de peso molecular suministrados por Boehringer Mannheim (Penzberg, Alemania).

El índice de pureza se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y a 260 nm en un espectrofotómetro Beckman DV 640 y determinando la relación A_{260}/A_{280} , siendo adecuado para el DNA un resultado de 1.8-2.

La concentración de DNA se obtenía midiendo la absorbancia a 260 nm, considerando que un valor de 1 equivale a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ para oligonucleótidos, de 50 $\mu\text{g/ml}$ para DNA de doble cadena y 40 mg/ml para RNA.

4.7. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.

La digestión de DNA con las distintas enzimas de restricción se llevó a cabo según especifica Sambrook *et al.* (1989), utilizando enzimas y tampones de la casa Boehringer.

4.8. Desfosforilación del extremo 5' del DNA.

Para evitar la recircularización del vector cuando éste había sido digerido con una única enzima de restricción, se llevó a cabo la desfosforilación de los extremos 5' del DNA mediante el tratamiento de éste con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), siguiendo el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). La enzima y el tampón eran los suministrados por la casa Boehringer.

4.9. Ligación del DNA.

De nuevo se siguieron las recomendaciones de Sambrook *et al.*, (1989) utilizando la DNA ligasa del fago T4 y el tampón adecuado procedente de Boehringer. Las ligaciones se llevaban a cabo a 13° C durante 12-16 horas.

4.10. Transformación del DNA.

La transformación de las distintas cepas de *E. coli* se llevó a cabo mediante el método descrito por Hanahan (1985).

La transformación de *S. cerevisiae* se llevó a cabo utilizando células enteras tratadas con cationes alcalinos (acetato de litio), según el método descrito por Ito *et al.*, (1983). En el caso de transformaciones con plásmidos cuya selección era *LEU2-d*, la transformación se llevó a cabo por el método de protoplastos descrito por Hinnen *et al.* (1978).

4.11. Hibridación DNA-DNA.

4.11.1. Marcaje no radiactivo de fragmentos de DNA con digoxigenina.

Los fragmentos de DNA de *S. cerevisiae* empleados como sondas genéticas fueron marcados, utilizando la reacción de PCR utilizando la Taq DNA polimerasa, nucleótidos marcados con digoxigenina, sintetizándose moléculas que llevan incorporadas moléculas de digoxigenina (Emanuel, 1991).

Los nucleótidos no incorporados se separaron del producto de PCR según se describe en el apartado 4.5 de esta sección.

4.11.2. Transferencia de DNA. Detección de secuencias específicas.

Los procesos de desnaturalización, neutralización y transferencia del DNA de los geles de agarosa a membranas de Nylon (Biodyne, Pall), fueron realizados básicamente de acuerdo a la técnica originalmente desarrollada por Southern (1975), introduciendo las modificaciones descritas por Sambrook *et al.*, (1989).

La prehibridación e hibridación de sondas al DNA fijado en las membranas se realizó de acuerdo con los protocolos recogidos por Sambrook *et al.*, (1989). La incubación de la sonda con las membranas, se realizó a 68°C en el caso de que existiese un 100% de homología sonda-gen, y a 50°C en el caso de porcentajes de homología menores desconocidos en las hibridaciones heterólogas con sonda de *S. cerevisiae* sobre DNA de *P. pastoris*. En el primer caso los lavados se realizaron a 68°C y a temperatura ambiente, en el otro los lavados fueron a 50°C y a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo utilizando el "Genius System" (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

4.12. Hibridación RNA-DNA.

4.12.1. Marcaje no radiactivo de fragmentos de DNA con biotina.

El marcaje de las sondas genéticas se realizó con nucleótidos marcados con biotina empleando la técnica de PCR, purificándose el producto amplificado según lo descrito en el apdo. 4.5 de esta sección.

4.12.2. Transferencia de RNA. Detección de secuencias específicas.

Las muestras de RNA fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa conteniendo formaldehído, posteriormente transferidos a membranas de Nylon (Biodyne, Pall), estos procesos fueron realizados de acuerdo a la técnica originalmente desarrollada por Alwine *et al.*, (1977), introduciendo las modificaciones descritas por Sambrook *et al.*, (1989).

La prehibridación e hibridación de sondas de DNA al RNA fijado a las membranas se realizó de acuerdo con los protocolos recogidos por Sambrook *et al.*, (1989). La incubación de la sonda con las membranas, se realizó a 68°C. Posteriormente, se llevaron a cabo tres lavados de 5 minutos, uno a 68°C y dos a temperatura ambiente. El proceso de revelado se efectuó utilizando el "PolarPlex Chemiluminiscent blotting kit" (Millipore) según las especificaciones indicadas por los fabricantes.

4.13. Secuenciación de DNA.

La determinación de la secuencia de los productos de PCR se llevó a cabo mediante secuenciación automática en el Servicio de Secuenciación de la Universidad Complutense dotado de un secuenciador automático de la casa Pharmacia modelo ALF. Las muestras de DNA fueron preparadas mediante lisis alcalina seguida de purificación con una columna Quiagen (Quiagen, Inc). La secuencia en ambas cadenas de los productos de PCR fue obtenida mediante el uso de los iniciadores universales M13 ("universal primer" y "reverse primer").

4.14. Amplificación de DNA mediante PCR.

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.*, 1985), se realizó en un aparato DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer) de acuerdo a las técnicas descritas en el manual de Sambrook *et al.*, (1989) y en el de Innis *et al.*, (1990).

Las condiciones de amplificación eran diferentes según las características del DNA molde a amplificar y las características de los oligonucleótidos a emplear:

-amplificación de las formas solubles de las cadenas α y β de la proteína HLA-DP. Las condiciones fueron: (94°C 2', 45°C 5', adición Taq DNA polimerasa, 72°C 2') 1 ciclo, (94°C 1', 50°C 1', 72°C 2') 28 ciclos, (94°C 1', 50°C 1', 72°C 10') 1 ciclo.

-amplificación del gen quimérico de HLA-DP conteniendo ambas cadenas unidas por un adaptador sintético mediante PCR solapante (Higuchi *et al.*, 1990), las condiciones seguidas

fueron: para la primera PCR fueron idénticas a las descritas para las formas solubles; la segunda PCR, que es la PCR solapante, se realizó en las siguientes condiciones, (94°C 2', 45°C 5', adición Taq DNA polimerasa, 72°C 2') 3 ciclos, (94°C 1', 50°C 1', 72°C 2') 25 ciclos, (94°C 1', 50°C 1', 72°C 10') 1 ciclo.

-amplificación de homólogos del gen *SLT2* empleando los oligonucleótidos degenerados a partir de DNA genómico de *P. pastoris*, las condiciones utilizadas fueron: (96°C 3', 50°C 5', adición de Taq DNA polimerasa, 72°C 1') 1 ciclo, (94°C 1', 55°C 1', 72°C 1') 28 ciclos, (94°C 1', 55°C 1', 72°C 10') 1 ciclo.

4.14.1. Clonación de los productos de PCR.

La clonación de los productos amplificados mediante PCR se basa en la propiedad de algunas DNA polimerasas termoestables, entre ellas la Taq, de adicionar una adenina en los extremos 3' fuera de molde (Clark, 1988). Esta característica ha permitido el desarrollo de vectores dotados de una timina extra que hace posible la clonación de los productos de PCR directamente. En este trabajo se ha utilizado el pT7Blue-Tvector[®] (Novagen, Madison USA) siguiendo las instrucciones especificadas por los fabricantes.

5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

5.1. Preparaciones de proteínas.

5.1.1. Obtención de células y sobrenadantes de cultivo.

Las células se separaban de los medios de cultivo por centrifugación a 2000g durante 5 minutos a 4°C, se lavaban con agua destilada, suplementada con sorbitol 1 M cuando las células eran de estirpes líticas y habían sido cultivadas en medios estabilizados osmóticamente, quedando listas para su procesamiento posterior.

Los sobrenadantes de estos cultivos fueron empleados para valorar distintas actividades enzimáticas, CAT y fosfatasa alcalina, directamente sin necesidad de concentración y como muestras para realizar electroforesis de proteínas. En caso de que fuera necesaria su concentración, ésta se realizaba bien por ultrafiltración empleando un filtro de tamaño de exclusión de 10000 daltons, o por precipitación con sulfato amónico. La precipitación de proteínas con sulfato amónico se realizaba a 4°C añadiendo la cantidad deseada de sulfato amónico, 30' de reposo y centrifugación a 10000g durante 10 minutos, separando posteriormente el precipitado del sobrenadante, el cual podía volver a ser precipitado de nuevo. El precipitado era resuspendido en buffer TE.

5.1.2. Preparación de extractos celulares.

Los extractos celulares se obtuvieron por rotura mecánica. Las células se resuspendían en buffer con polvo de vidrio Ballotini (0.4 mm de diámetro) en proporción 1:1 (v:v) procediéndose a la ruptura por agitación en vortex durante tres períodos de 60", refrigerando los tubos el mismo tiempo en hielo entre cada período de agitación.

Por observación directa al microscopio de contraste de fases se comprobó la rotura de las células para comprobar que el porcentaje de células rotas fuera superior al 90%.

La separación de los restos celulares se realizó por centrifugación a 10000g durante 15' a 4°C, los sobrenadantes de esta centrifugación eran los extractos solubles libres de células empleados como muestras para valorar las actividades enzimáticas y para la realización de las electroforesis de proteínas.

La solución tampón empleada en la rotura mecánica de las células era buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM EDTA, con inhibidores de proteasas: PMSF, aprotinina, antipafina, leupeptina y pepstatina A a una concentración de 625 mg/l).

5.1.3. Obtención de proteínas intracelulares por choque osmótico.

Este tipo de preparaciones proteicas intracelulares podían ser obtenidas por medio de un choque osmótico, lo que requería el empleo de cepas *slt2*. Las células creciendo en fase exponencial en presencia de estabilización osmótica a 37°C, se recogían, se lavaban con agua destilada estabilizada osmóticamente, y se resuspendían en buffer TE durante 15', lo que provocaba la lisis celular. El sobrenadante conteniendo las proteínas solubles era separado de los restos celulares por centrifugación a 2000g durante 10', siendo el sobrenadante apto para ensayar actividades enzimáticas.

5.2. Valoración de fosfatasa alcalina en *S. cerevisiae*.

5.2.1. Valoración cualitativa.

Se realiza con BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato), este reactivo es un sustrato de fosfatasa que, al ser hidrolizado por dicha enzima, da lugar a una coloración azul.

Las cepas a analizar se siembran en las placas con BCIP (40 mg/ml) y se incuban a 37°C durante 24-48 horas. Al cabo de este tiempo, las cepas autolíticas aparecen teñidas de color azul debido a la liberación de la fosfatasa alcalina.

5.2.2. Valoración cuantitativa.

La fosfatasa alcalina es una enzima intracelular, que sólo se libera al medio cuando la célula se lisa, luego su valoración nos da idea del grado de lisis del cultivo. Esta enzima es capaz de hidrolizar el sustrato paranitrofenil fosfato disódico (PNPPNa₂), liberando paranitrofenol (PNP), el cual a pH alcalino es de color amarillo (Cabib *et al.*, 1975).

La solución enzimática a valorar provenía de sobrenadantes del cultivo de células. Las mezclas de reacción contenían 500 µl de una solución del sustrato PNPPNa₂ 20 mM en tampón glicina-sosa 0.1 M pH:9.8, a los cuales se añadía otros 500 µl del sobrenadante a analizar. La reacción se incubaba a 37°C en oscuridad hasta aparición de coloración amarilla. La valoración

del PNP se llevaba a cabo espectrofotométricamente, leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Las lecturas obtenidas se referían a una curva patrón de PNP de concentraciones comprendidas entre 10 y 180 µg/ml. La unidad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nanomol de PNP por minuto en las condiciones de la reacción, determinándose su número en función de la ecuación:

$$UE = [\mu\text{g/ml}] / 139,11 \times 2000/t$$

siendo t el tiempo de reacción en minutos.

5.3. Valoración de la actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en *S. cerevisiae*.

La actividad CAT se midió según describe Shaw (1975) utilizando como sustrato 5-5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB). La actividad CAT se cuantificó tanto en extractos celulares solubles de *S. cerevisiae* como en muestras de sobrenadante de los cultivos.

La reacción se basa en el aumento de absorbancia a 412 nm debido a la producción de 5-tio-2-nitrobenzoato, sustancia con coeficiente de extinción molar de 13600 a dicha longitud de onda. La unidad enzimática de CAT se describe como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 mmol de 5-tio-2-nitrobenzoato por minuto a 25°C. La composición de la solución tampón de reacción es: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTNB, 0.4 mM AcCoA (Hadfield *et al.*, 1987).

Las mezclas de reacción se realizaban en 1 ml de volumen final utilizando 100 µl de sobrenadante de cultivo de células ó 20 µl de extracto celular, completando hasta 1 ml con la solución tampón de reacción.

5.4. Determinación cuantitativa de proteínas.

5.4.1. Método de Bradford.

La valoración de la cantidad de proteína de una muestra se determinó siguiendo el método descrito por Bradford (1976), utilizando una solución de albúmina sérica bovina de concentración conocida (2.5-25 µg/ml) para hacer una curva patrón. El reactivo de Bradford fue suministrado por la casa Bio-Rad.

5.4.2. Método espectrofotométrico.

Un segundo procedimiento utilizado en la estimación de la concentración de proteína en una muestra se realizó midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DV 640 y considerando que 1 unidad de absorbancia a 280 nm equivale a una concentración de 1 mg/ml.

5.5. Electroforesis de proteínas.

5.5.1. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli (1970). Los geles separadores eran de poliacrilamida al 10% y contenían SDS al 0,1%. La electroforesis se desarrollaba en cubetas Bio-Rad 150-A a una intensidad fija de 40 mA o bien a un voltaje constante de 60 V. Como marcadores de peso molecular se emplearon patrones suministrados por Bio-Rad.

5.6. Revelado de proteínas en geles de poliacrilamida.

La detección de las proteínas en geles de poliacrilamida se llevó a cabo mediante su tinción con Azul Brillante de Coomassie R-250 y posterior decoloración según Sambrook *et al.*, (1989).

Cuando era precisa una mayor sensibilidad, se recurría a la tinción con nitrato de plata, de acuerdo a Merrill *et al.*, (1982), utilizando el "kit" de tinción suministrado por Bio-Rad.

Los geles se secaban sobre papel 3 MM o entre papel celofán, en un secador de geles a vacío (Bio-Rad 483 acoplado a una bomba de vacío Telstar MS-5) a 80°C durante 2 horas.

6. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.

6.1. Transferencia de proteínas e inmunodetección.

Las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida (400 µg/muestra) se transfirieron a membranas Immun-lite (Bio-Rad) de acuerdo a Towbin *et al.*, (1979). Las transferencias se llevaban a cabo en una cubeta de transferencia Bio-Rad durante tres horas a una intensidad constante de 250 mA.

Se utilizó el kit bioluminiscente Immun-lite, suministrado por Bio-Rad, siguiendo sus instrucciones.

El anticuerpo policlonal anti-VLP se utilizaba a una dilución 1:25000.

6.2. Marcaje intracitoplasmático de células de levadura. Detección mediante citometría de flujo.

Es una técnica basada en la permeabilización de las células de levadura para permitir el acceso al interior del anticuerpo. La unión del primer anticuerpo es detectada por reacción de éste con un segundo anticuerpo conjugado capaz de emitir fluorescencia.

Las células de *S. cerevisiae* tras crecer a 28°C durante 15-24 horas, se recogían por centrifugación 2000g durante 5', se lavaban dos veces con PBS y se permeabilizaban por tratamiento con BFA durante 30', a continuación se lavaban de nuevo dos veces con PBS, se incubaban con el anticuerpo frente a la proteína que se quiere detectar durante 60' a 4°C con agitación suave, se lavaban dos veces con PBS, se incubaban a continuación con el anticuerpo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 50' a 4°C con agitación suave, se lavaban las células con PBS y se añadía yoduro de propidio al 0.005%, para comprobar que la permeabilización celular había sido correcta. El anticuerpo HLA-DP utilizado fue B7/21 en una dilución 1:1000.

El PBS se preparó según se describe en Sambrook *et al.* (1989). La composición del BFA es: Na₂HPO₄, 200 mg/l; KH₂PO₄, 1 g/l; acetona 450 ml/l, formaldehído 37%, 250 ml/l, H₂O, 300 ml/l; el pH 6.8.

III. RESULTADOS

1. PRODUCCIÓN Y LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN CEPAS AUTOLÍTICAS DE *S. cerevisiae*.

1.1. Liberación de proteínas heterólogas al medio de cultivo por la cepa autolítica LD1 de *S. cerevisiae* mediante choque térmico.

La cepa de *S. cerevisiae* elegida para realizar los ensayos de liberación de proteínas heterólogas intracelulares fue LD1, una cepa mutante en el gen *SLT2*, diploide homocigótica para la mutación *slt2 D-35*, que en los ensayos de caracterización fenotípica previa había demostrado una eficiente expresión del fenotipo autolítico consistente en presentar lisis a la temperatura de 37°C con liberación del contenido intracelular al medio de cultivo (de la Fuente *et al.*, 1993). Para tratar de aprovechar esta característica, desde el punto de vista biotecnológico, estudiamos la capacidad de los mutantes para liberar proteínas heterólogas al medio extracelular. La proteína heteróloga intracelular elegida fue la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT), de origen bacteriano, por ser producida intracelularmente y presentar un ensayo colorimétrico fácil de realizar (Shaw, 1975). Además esta levadura no presenta actividad enzimática similar con lo que eliminamos la posibilidad de interferencias de proteínas homólogas en el ensayo colorimétrico de detección (Hadfield *et al.*, 1987).

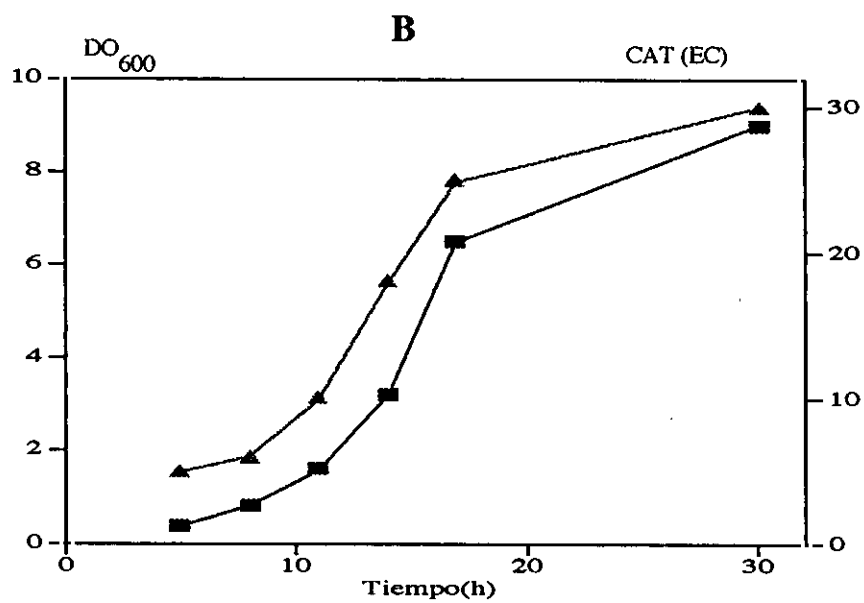
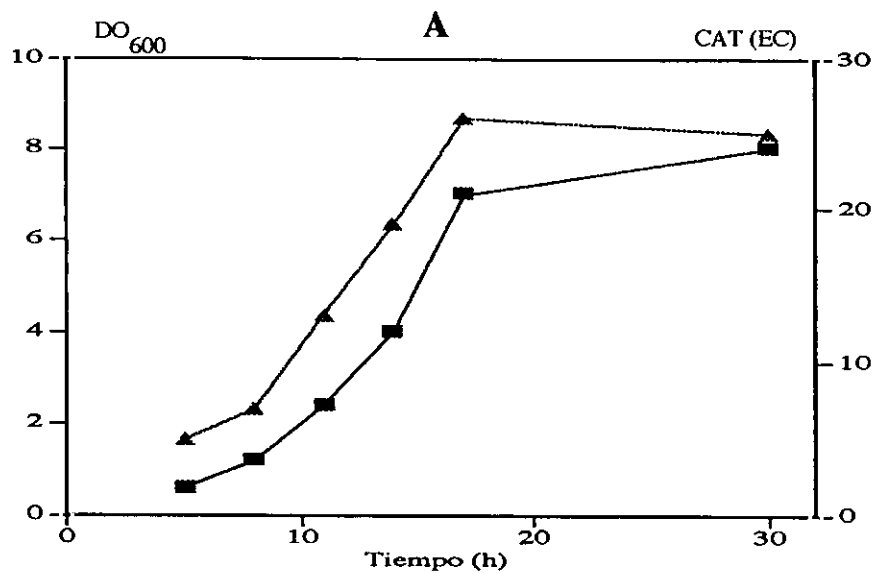
1.1.1. Producción de CAT en la cepa LD1. Ensayo en matraz.

En primer lugar, con el fin de ensayar la medición de actividad CAT y comprobar su producción intracelular en la cepa LD1, transformamos esta cepa con el plásmido de expresión de CAT pCH100L. Este plásmido procede del pCH100 (Hadfield *et al.*, 1986), desarrollado con el gen *TRP1* como marcador de auxotrofia para la transformación en *S. cerevisiae*, al que fue necesario introducir el gen *LEU2* como marcador de auxotrofia para poder transformar la cepa LD1. Dicho plásmido lleva el gen de la proteína CAT bajo el promotor del gen *ADC1* (Alcohol Deshidrogenasa 1) y el terminador del gen *CYC1* (Citocromo Oxidasa I).

Tras la transformación de la cepa LD1 con el plásmido pCH100L, procedimos a cuantificar la expresión intracelular de CAT valorando su actividad enzimática en extractos celulares de la cepa transformada crecida en cultivo discontinuo ("batch"), a escala de matraz a la temperatura de 24°C, a la que la cepa LD1 se comporta como una cepa silvestre. Utilizamos como cepa control para comparar los niveles de expresión de CAT la cepa silvestre para el carácter lítico DBY-746, transformada con dicho plásmido. Para que las medidas fueran comparables en todos los extractos celulares se tomaron cantidades de cultivo equivalentes a una DO de 10 y se completaron los extractos celulares en un volumen final de 1 ml, de tal forma que la expresión de la actividad enzimática como UE/ml indicaría las UE totales presentes en cada extracto celular.

Los resultados se muestran en la figura 3, observándose expresión de CAT en ambas cepas en unas cantidades detectables y crecientes a lo largo de la fase exponencial del cultivo, estabilizándose al llegar a la fase estacionaria (alrededor de unas 25-30 UE/ml), no observándose diferencias entre la cepa LD1 (Fig. 3A) y la DBY-746 (Fig. 3B). Luego el plásmido pCH100L dirige la expresión de CAT de forma eficiente y en una cantidad detectable. El nivel de expresión

Figura 3. Actividad CAT en extractos celulares. (A) Cepa LD1/pCH100L; (B) cepa DBY-746/pCH100L. Leyenda: (■), densidad óptica 600 nm; (▲), actividad CAT en extractos celulares (UE/ml). (C) Valores máximos de CAT en *S. cerevisiae*.



C

CEPA	Plásmido	AE	%CAT§
LD1	pCH100L	12.5	2.2
DBY-746	pCH100L	13.6	2.4

§: % de CAT respecto de la proteína total. Calculado a partir de la actividad específica de Tn9-CAT de 560 UE/mg de proteína.

de CAT obtenido representaba aproximadamente valores en torno al 2% sobre la proteína total (Fig. 3C), que resultaron similares a los valores descritos para el plásmido pCH100 (Hadfield *et al.*, 1987).

El siguiente objetivo era comprobar la producción de CAT a escala de fermentador y comprobar si la expresión del fenotipo lítico en la cepa LD1 conducía a la liberación de CAT al medio de cultivo.

1.1.2. Estudio de la producción y liberación de CAT al medio de cultivo .

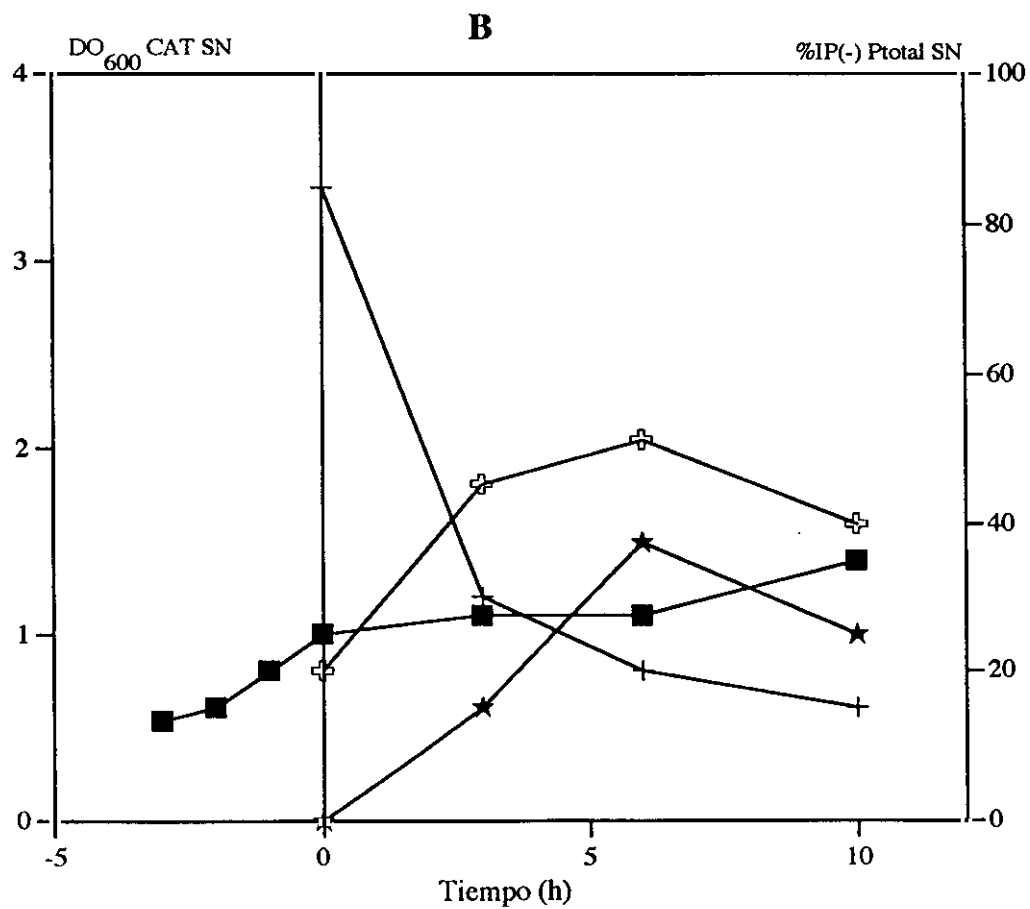
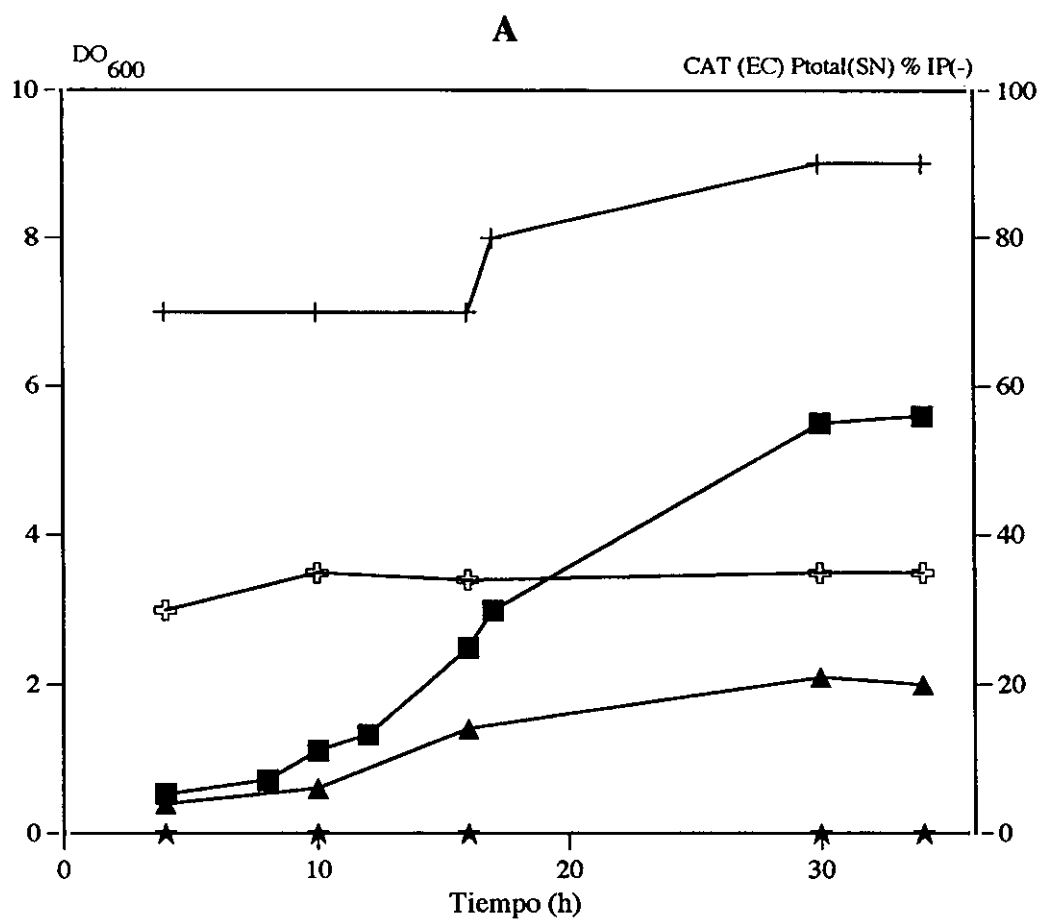
En primer lugar, realizamos un cultivo discontinuo en fermentador de 10 l a 24°C, con la cepa LD1 transformada con el plásmido pCH100L (Fig. 4A). En estas condiciones el cultivo mantiene una alta viabilidad, superior al 85%, a lo largo del tiempo; no detectándose actividad CAT en ningún momento en el medio de cultivo como era de esperar debido a la ausencia de lisis. En el extracto celular se detecta actividad CAT que presenta un patrón de producción creciente a lo largo de la fase exponencial del cultivo alcanzando 21 UE/ml, similar al observado a escala de matraz, 26 UE/ml (Fig. 3A). Asimismo los niveles de proteínas totales presentes en el medio de cultivo se mantienen constantes, en torno a 35 µg/ml.

A continuación repetimos el experimento realizando un choque térmico a 37°C en un cultivo creciendo inicialmente a 24°C, para obtener biomasa, con el objeto de estudiar la presencia de CAT en el medio de cultivo por expresión del fenotipo lítico. Antes del cambio de temperatura las células deben de estar creciendo en fase exponencial, ya que la expresión del fenotipo es dependiente de la presencia de crecimiento activo en el cultivo (Torres *et al.*, 1991).

En la figura 4B podemos observar que mientras el cultivo se mantenía a 24°C la actividad CAT en el medio de cultivo no es detectable, tras un cambio a 37°C, la lisis que sufrían las células se traducía en aparición de actividad CAT en el medio de cultivo. La aparición de actividad CAT, tras el cambio de temperatura, iba acompañada de un incremento de 2.5 veces en las proteínas totales presentes en el medio de cultivo, observándose una brusca disminución de la viabilidad como consecuencia de la lisis celular. El máximo de actividad CAT se logra a las seis horas del cambio térmico (1.5 UE/ml, 1.3 UE/DO) y coincide con el nivel máximo de proteínas en el caldo, 50 µg/ml, y con una lisis del 80% del cultivo, medida por citometría de flujo como porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio, el cual penetra en las células como consecuencia de la pérdida de permeabilidad selectiva que produce la expresión del fenotipo lítico, facilitando al análisis de grandes poblaciones celulares (de la Fuente *et al.*, 1992). Estos datos coinciden con observaciones previas que indicaban ese tiempo como el óptimo para la expresión del fenotipo lítico (de la Fuente *et al.*, 1993).

Los datos anteriores indicaban que la expresión del fenotipo lítico en la cepa LD1 por choque térmico permitía la liberación de una proteína heteróloga de localización intracelular, CAT, al medio de cultivo en un fermentador en condiciones de cultivo discontinuo.

Figura 4. (A) Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo discontinuo en fermentador de 10 l a 24°C; (B) idénticas condiciones con choque térmico a 37°C. Leyenda: (■), densidad óptica; (+), viabilidad expresada como porcentaje de células IP(-); (⊕), proteína total en el medio de cultivo (μg/ml); (▲) actividad CAT en extracto celular (UE/ml); (★), actividad CAT en el medio de cultivo (UE/ml).



Para realizar un estudio más detallado de la liberación de proteínas y comprobar la reproducibilidad del sistema realizamos un nuevo cultivo de la cepa transformada en fermentador con choque térmico a 37°C (Fig. 5).

El crecimiento se detiene debido a la caída de viabilidad por la lisis que experimenta el cultivo, pasando de niveles en torno 85-90% a 20% de células iódulo de propidio negativas tras 6 h a 37°C (Fig. 5); a continuación se estabiliza en torno a niveles del 25-30% observándose un incremento en la densidad óptica del cultivo, lo que nos indicaba que una fracción del cultivo continuaba creciendo y lisando, ya que no se producía recuperación en la viabilidad del cultivo.

También se observa un aumento en las proteínas totales presentes en el medio de cultivo, indicativo de que la lisis se acompaña de liberación del contenido intracelular, destacando que el valor máximo, 110 µg/ml a las 6 h (Fig. 5), representaba un incremento de 2.75 veces el nivel basal de proteína a 24°C, al igual que en el experimento anterior (Fig. 4B), coincidiendo además con el momento de mayor lisis del cultivo, observándose a continuación una disminución, obteniéndose al final del cultivo (34 h a 37°C) una cantidad similar a la presente en el medio de cultivo antes del cambio de temperatura (Fig. 5).

Se detecta actividad CAT (1 UE/ml) a partir de las 3 h del cambio térmico que va en aumento hasta las 6 h, 2 UE/ml, lo que se correlaciona con la máxima lisis del cultivo y máximo nivel de proteínas totales en el medio de cultivo, detectándose una disminución a partir de ese momento, al igual que ocurría con las proteínas totales, desapareciendo la actividad CAT a las 34 h del choque térmico. Las mismas observaciones tenían lugar en el caso de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, enzima intracelular de *S. cerevisiae* cuya valoración sirve como control de la liberación del contenido intracelular, que tras alcanzar un máximo a las 6 h decae hasta desaparecer a las 34 h (Fig. 5).

La desaparición de las actividades enzimáticas de CAT y de fosfatasa alcalina nos indica la posible presencia de proteólisis inespecífica ya que la lisis produce liberación de todas las proteínas de la levadura entre las que se encuentran las proteasas de origen vacuolar responsables de estos fenómenos (Hirsch *et al.*, 1989).

En la figura 6 se comparan mediante diagramas de barras los valores de proteínas totales (paneles A y C) y de actividad CAT (paneles B y D) presentes en los extractos celulares (obtenidos a partir de igual número de células, determinado por su DO) y en el medio de cultivo en los fermentadores crecidos a 24°C (Fig. 4A) y 37°C (Fig. 5). Para poder comparar los diferentes datos entre sí, se expresan como µg/DO los valores de proteínas totales y como UE/DO los datos de actividad CAT. En los extractos celulares obtenidos de muestras del fermentador a 24°C (panel A), no se observa disminución de la cantidad de proteína ni aumento en la proteína presente en el medio de cultivo, sin embargo en los extractos celulares del fermentador con choque térmico a 37°C (panel C), sí se observa una disminución, tomando como extracto celular de referencia el obtenido a 24°C en el momento del cambio a 37°C. Los sucesivos extractos celulares, obtenidos tras el choque térmico, contienen una menor cantidad de proteína, a medida que se observa un incremento en las proteínas totales de los caldos. Esto ocurre hasta las 6 h, ya que se observa que a las 15 h y 34 h después del choque térmico la disminución de proteína en el

Figura 5. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo discontinuo en fermentador de 10 l a 24°C con cambio térmico a 37°C. Leyenda: (■), densidad óptica; (+), viabilidad expresada como porcentaje de células IP(-); (⊕), proteína total en el medio de cultivo (µg/ml); (★), actividad CAT en el medio de cultivo (UE/ml); (▽), actividad fosfatasa alcalina en el medio de cultivo (UE/ml); el cambio térmico de 24°C a 37°C se representa por la línea vertical.

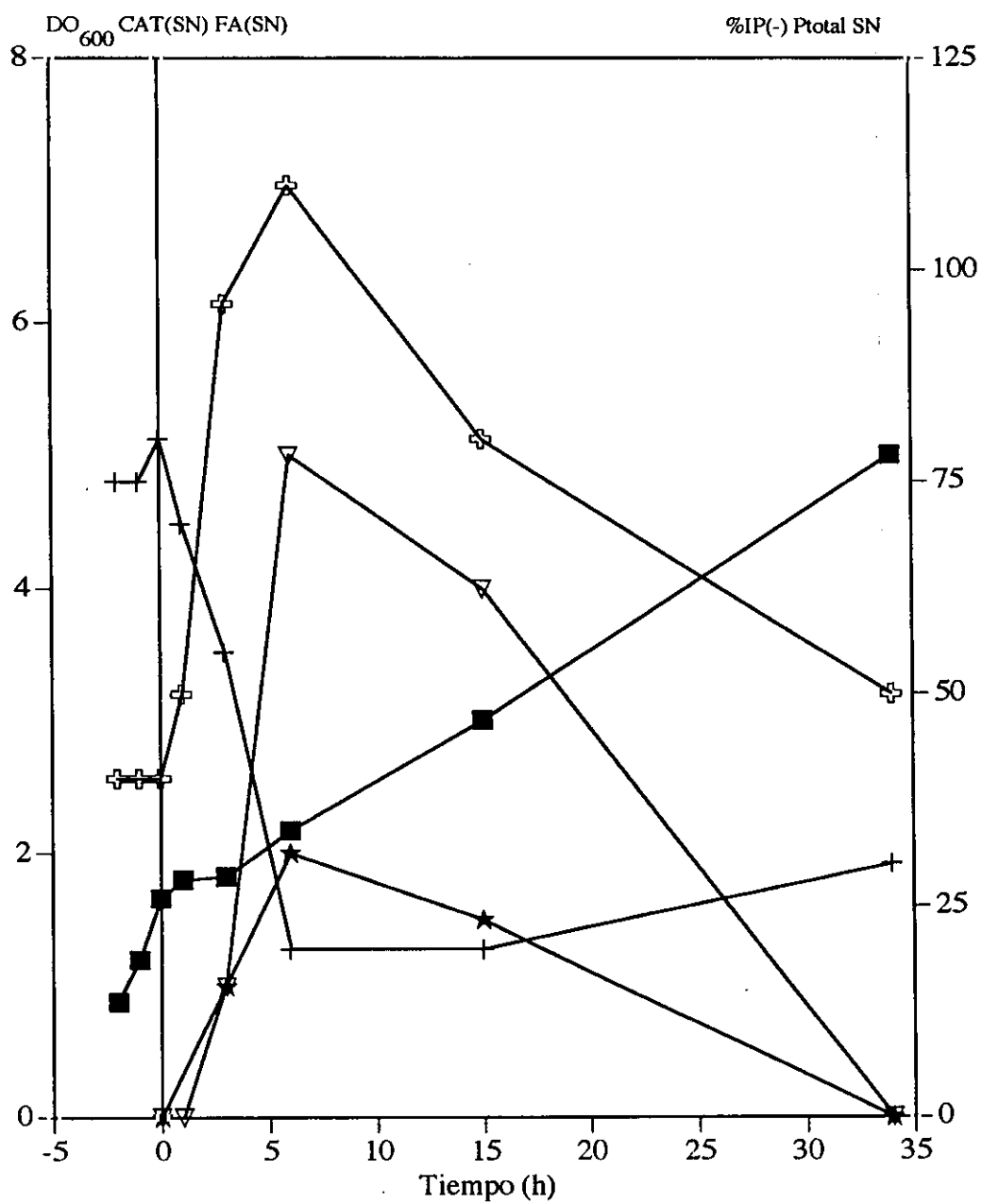
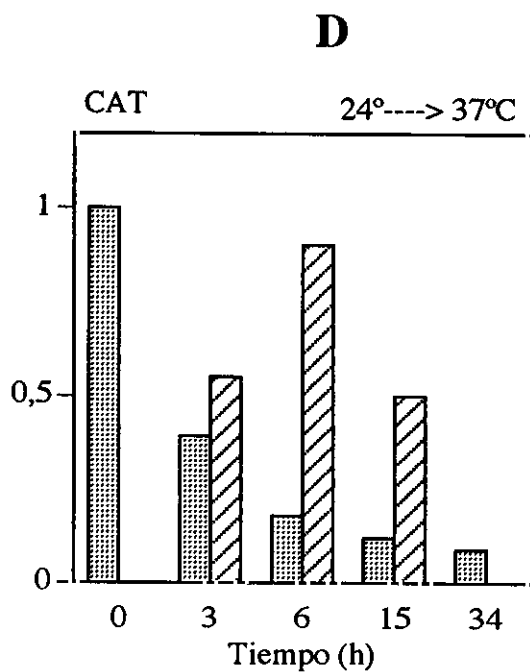
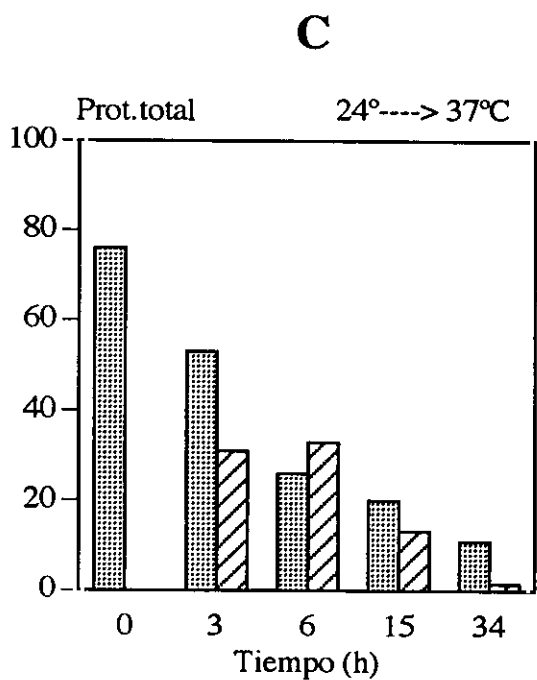
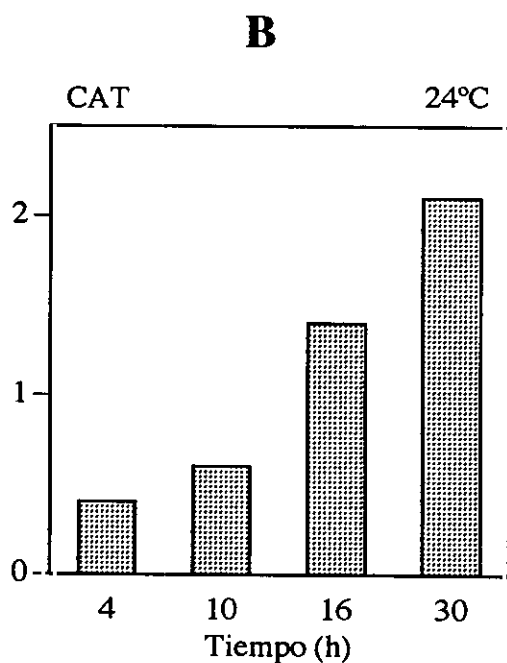
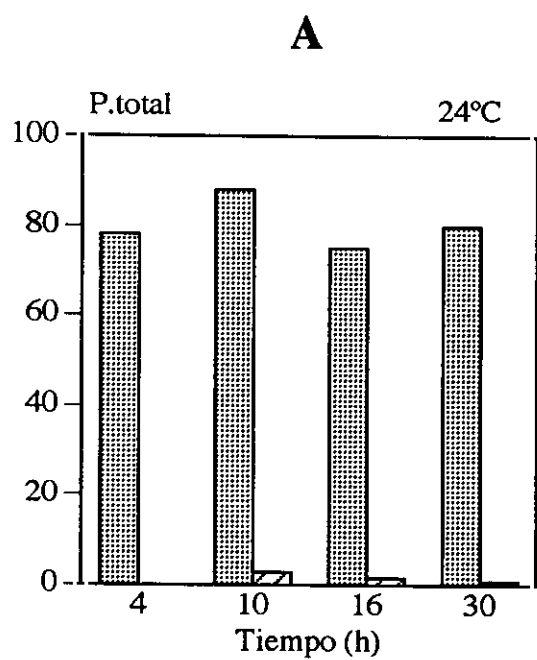


Figura 6. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo discontinuo en fermentador de 10 l a 24°C (paneles A y B), y a 24°C con cambio térmico a 37°C (paneles C y D). Se representan los valores de proteína total en μg y actividad enzimática CAT en UE, por densidad óptica de cultivo. Las barras punteadas corresponden a medidas efectuadas con extractos celulares y las barras rayadas son medidas realizadas en el medio de cultivo. En el panel B los valores obtenidos en el medio de cultivo no se representan, ya que fueron cero en todos los casos.



▨ Valores obtenidos con extractos celulares.

▧ Valores obtenidos con sobrenadantes de medios de cultivo.

extracto celular no se correlaciona con un aumento en el caldo. El nivel final de proteína en el extracto celular representa el 15% de la cantidad inicial de proteína.

En la misma figura 6 se observa un fenómeno similar en el caso de la actividad CAT; a 24°C (panel B) la actividad es únicamente detectable en el extracto celular, y se incrementa a lo largo de la fase exponencial de crecimiento. En cambio, a 37°C (panel D) en el momento del cambio de temperatura, considerado tiempo cero, toda la actividad se detectaba en el extracto celular, observándose como la disminución de actividad CAT en el extracto celular significa un aumento de la misma en el caldo en una cantidad equivalente hasta las 6 h; a partir de ese momento la actividad sigue disminuyendo en el extracto celular, mientras que en el caldo comienza a disminuir a las 15 h, para desaparecer a las 34 h. La actividad CAT remanente en el extracto celular a las 34 h era el 9.6% de la inicial.

Se puede concluir que hay una liberación de CAT a las 6 h del choque térmico equivalente al 82% de la actividad CAT inicialmente detectada en el interior de las células, pero que a partir de ese momento la liberación simultánea de proteasas conduce a la degradación de la enzima CAT, ya que la cantidad de proteínas totales y la actividad enzimática en los extractos celulares disminuye, pero no se mantiene estable la actividad en el caldo.

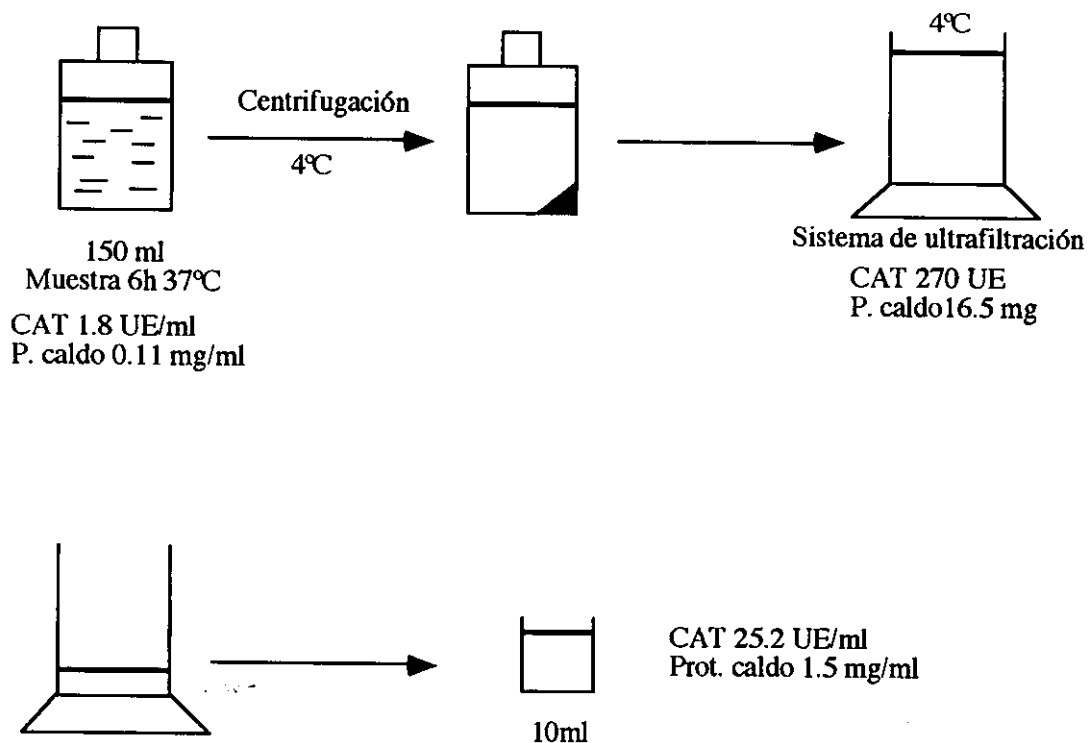
1.1.3. Concentración de CAT liberado al medio de cultivo.

A continuación tratamos de ver la posibilidad de concentrar la proteína CAT liberada al medio, de cultivo de forma preparativa, con el fin de obtener preparaciones de proteínas más concentradas y por tanto, más adecuadas para iniciar posteriores procesos de purificación. Para ello se siguieron dos métodos: precipitación con sulfato amónico y concentración por ultrafiltración con corte de 10.000 daltons de peso molecular, el CAT tiene un peso de aproximadamente 25.000 daltons.

La ultrafiltración (Fig. 7) se realizó concentrando 150 ml de medio de cultivo, correspondiente a 6 h a 37°C (Fig. 5), hasta un volumen final de 10 ml, es decir se concentró 15 veces. La actividad inicial total en los 150 ml del medio antes de concentrar era de 270 UE y tras la concentración las unidades enzimáticas totales eran 252 UE (93%). En términos de proteínas totales la cantidad inicial era de 16.5 mg, y la final de 15 mg (90%). Esto indicaba que la recuperación de la actividad era elevada, si bien no se lograba un grado de purificación elevado, obteniéndose una preparación de proteínas de mucho menor volumen que permitiría iniciar procesos de purificación con mayor comodidad en el manejo de la muestra.

En la precipitación con sulfato amónico (Fig. 8) la recuperación de actividad CAT que se obtiene con un 60% de sulfato amónico fue del 65% de la actividad CAT, mientras que la proteínas totales precipitada es el 27%, lográndose un factor de purificación de 2.4, lo que junto a la reducción de volumen lograda permitiría proseguir con el proceso de purificación.

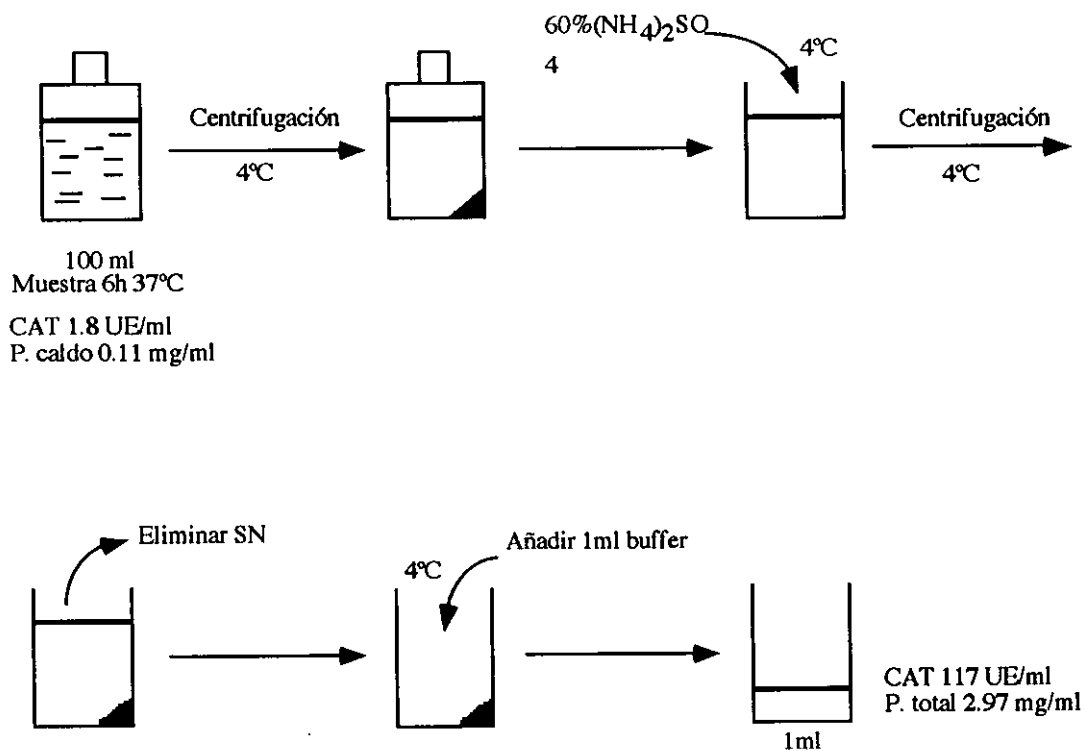
Figura 7. Esquema y resultados de la concentración de la proteína CAT en sobrenadantes de medios de cultivo realizada por ultrafiltración.



Sin concentrar 150 ml			Concentrado por ultrafiltración 10 ml		
Proteína caldo (mg)	Actividad CAT		Proteína caldo (mg)	Actividad CAT	
	UE	AE		UE	AE
0.11 mg/ml 16.5 mg total (100%)	1.8 UE/ml 270 UE total (100%)	16.4	1.5 mg/ml 15 mg total (90%) §	25.2 UE/ml 252 UE total (93%) §	16.8

§ Rendimiento del proceso

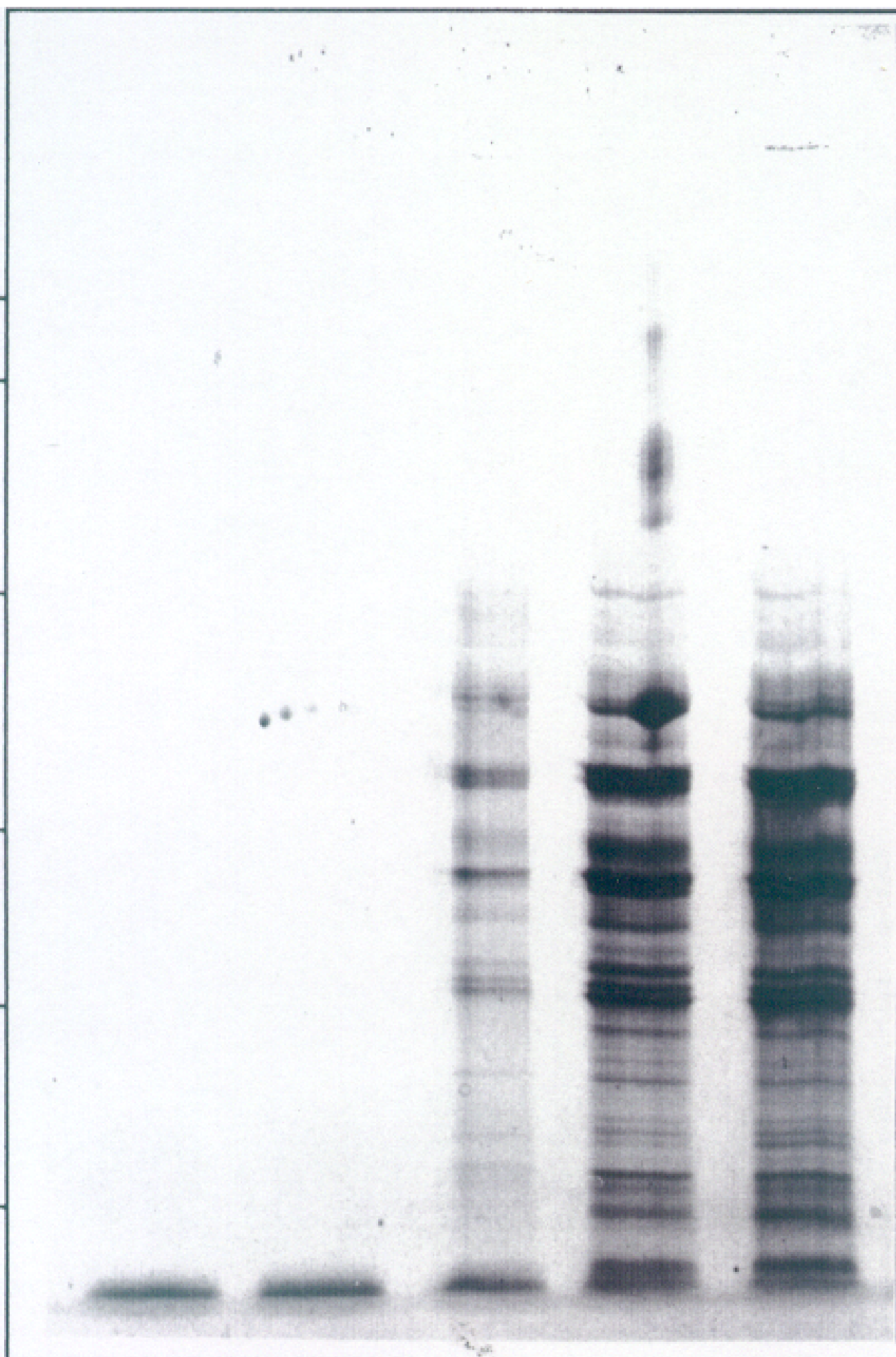
Figura 8. Esquema y resultados de la precipitación con sulfato amónico de la proteína CAT presente en sobrenadantes de medio de cultivo.



Sin concentrar 100 ml			60%(NH ₄) ₂ SO ₄ 1 ml			
Proteína caldo (mg)	Actividad CAT		Proteína caldo (mg)	Actividad CAT		Factor purificación*
	UE	AE		UE	AE	
0.11 mg/ml 16.5 mg (100%)	1.8 UE/ml 270 UE (100%)	16.4	2.97 mg/ml (27%) §	117 UE/ml (65%) §	39.3	2.4

*AE de la fracción precipitada con sulfato amónico dividida por la AE de la muestra original
§ Rendimiento del proceso.

Figura 9. Perfil electroforético de las proteínas presentes en el sobrenadante de un medio de cultivo a 24°C y a 37°C, en las cepas TD28 (*SLT2*) y LD1 (*slt2*). En todas las calles se han utilizado muestras de 20 µl de sobrenadante de medio de cultivo. Calle 1, sobrenadante de cultivo de TD28 a 24°C; calle 2, sobrenadante de TD28 tras 6 horas a 37°C; calle 3, sobrenadante de LD1 a 24°C; calle 4: sobrenadante de LD1 tras 3 horas a 37°C; calle 5: sobrenadante de LD1 tras 6 horas a 37°C.

1**2****3****4****5****200****97****68****43****29****18**

1.1.4. Perfil electroforético de las proteínas liberadas al medio de cultivo.

Con objeto de determinar qué tipo de proteínas eran liberadas en una lisis por choque térmico y saber si había liberación selectiva de algún tipo de proteínas, se realizó una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS utilizando como muestras volúmenes iguales (20 µl) de medios de cultivo a 24°C y a diferentes tiempos a 37°C. La tinción del gel con plata reveló (Fig. 9), que en la cepa LD1 a 24°C la proteína extracelular es indetectable mientras que a 37°C aparece un perfil de bandas similar al presente en un extracto celular, mientras que en una cepa silvestre para el carácter lítico (TD28) no se observa la presencia de proteínas en caldos a 37°C. Se concluye pues que la lisis por choque térmico que tiene lugar en la cepa LD1 produce una liberación inespecífica de proteínas sin distinción de tamaño y similar a las presentes en un extracto celular, lo que hace factible la liberación de cualquier proteína heteróloga intracelular.

1.2. Estudio de la cepa LD1 a escala semiindustrial.

Los estudios se llevaron a cabo en la Sección de Fermentación Microbiana del Departamento de Biotecnología de ZENECA Pharmaceuticals en el Reino Unido. En dicha Sección se disponía de una planta de fermentación equipada con un sistema que permite llevar a cabo fermentaciones alimentadas controlando el cociente respiratorio (RQ) del cultivo (Fieschko *et al.*, 1987), imitando las condiciones de trabajo de una planta de producción. El sistema se ilustra en la figura 10, la salida de gases del fermentador se encuentra conectada a un analizador de gases que mide el contenido del aire que sale del fermentador en O₂ y CO₂; los valores de esa medida son analizados por un ordenador, que calcula en tiempo real el valor del cociente respiratorio ($RQ = CO_2/O_2$), y decide en función del valor del mismo activar o desactivar la bomba dosificadora de medio que se encuentra conectada en serie con el ordenador.

1.2.1. Estudio de la capacidad y velocidad de crecimiento de la cepa LD1.

La cepa elegida para realizar las fermentaciones alimentadas fue la cepa LD1, con la que se habían realizado originalmente los estudios de liberación de proteínas heterólogas en experimentos en cultivos discontinuos. En primer lugar, era necesario evaluar el comportamiento de la cepa LD1 en este sistema de fermentación alimentada. Se ensayó la capacidad de crecimiento, es decir producción de biomasa y viabilidad del cultivo a la temperatura permisiva de 24°C. Los medios de cultivo elegidos fueron: medios complejos y sintéticos.

1.2.1.1. Crecimiento en medio sintético completo.

El crecimiento a 24°C de la cepa LD1 en medio sintético completo se describe en las figuras 11 y 12. Tras la inoculación la densidad óptica del fermentador fue de 0.35, observándose una fase de latencia de unas 40 h, durante la cual el cociente respiratorio no se estabiliza y no hay aporte continuo de medio fresco por parte de la bomba dosificadora (Figs. 11 y 12). Tras este período, se inicia la fase exponencial de crecimiento caracterizada por una estabilización del cociente respiratorio del cultivo, lo que hace que la bomba incremente de forma creciente el aporte de medio de cultivo fresco (Fig. 12), para soportar el crecimiento que tiene lugar,

Figura 10. Esquema del sistema de fermentación alimentada basado en el coeficiente respiratorio (RQ).

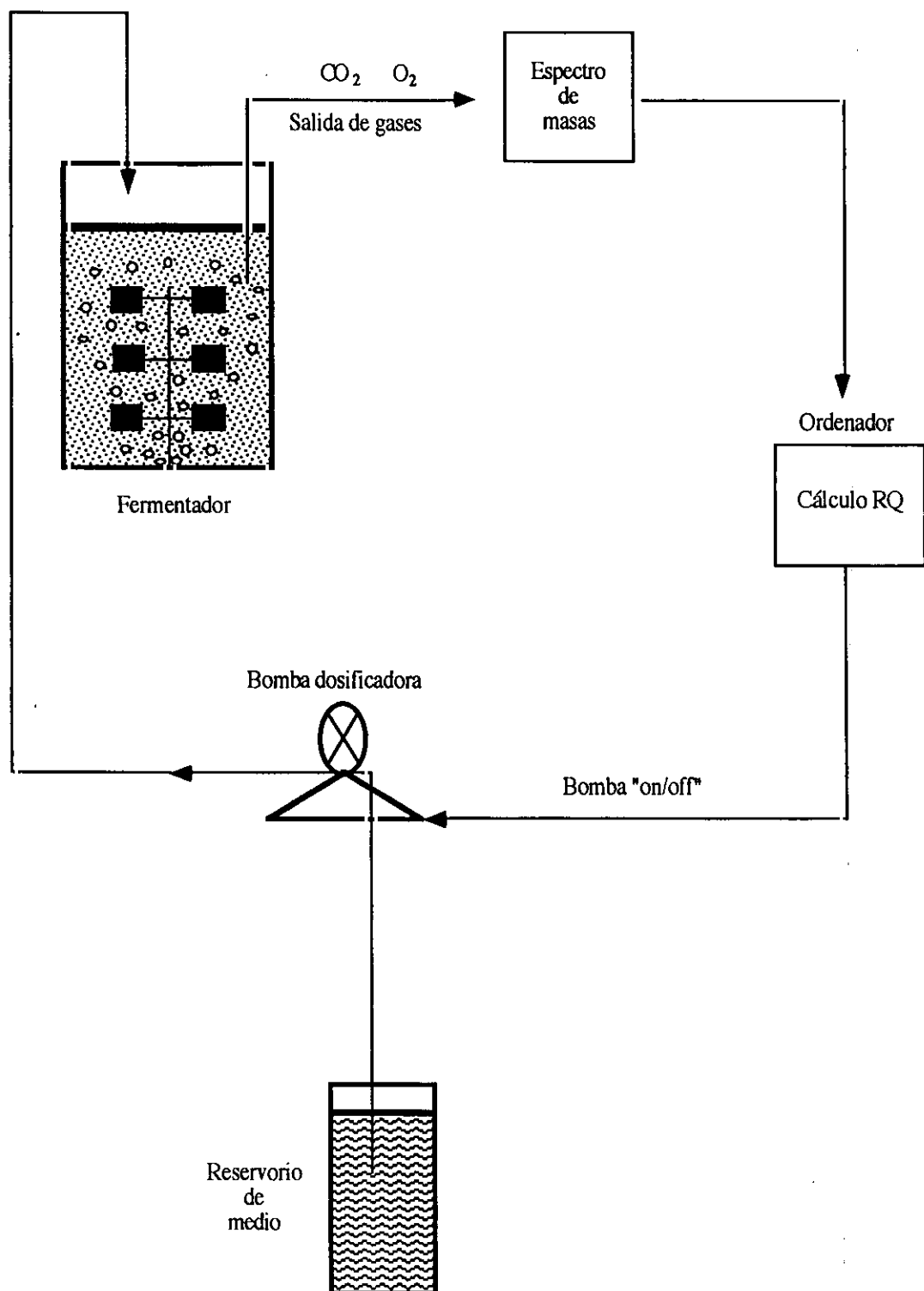


Figura 11. Cepa LD1 crecida en cultivo alimentado en fermentador a 24°C en medio sintético. Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (▲), número de células viables, 10^7 cél/ml; (●), biomasa del cultivo en g/l; (◆), presión de oxígeno en el cultivo.

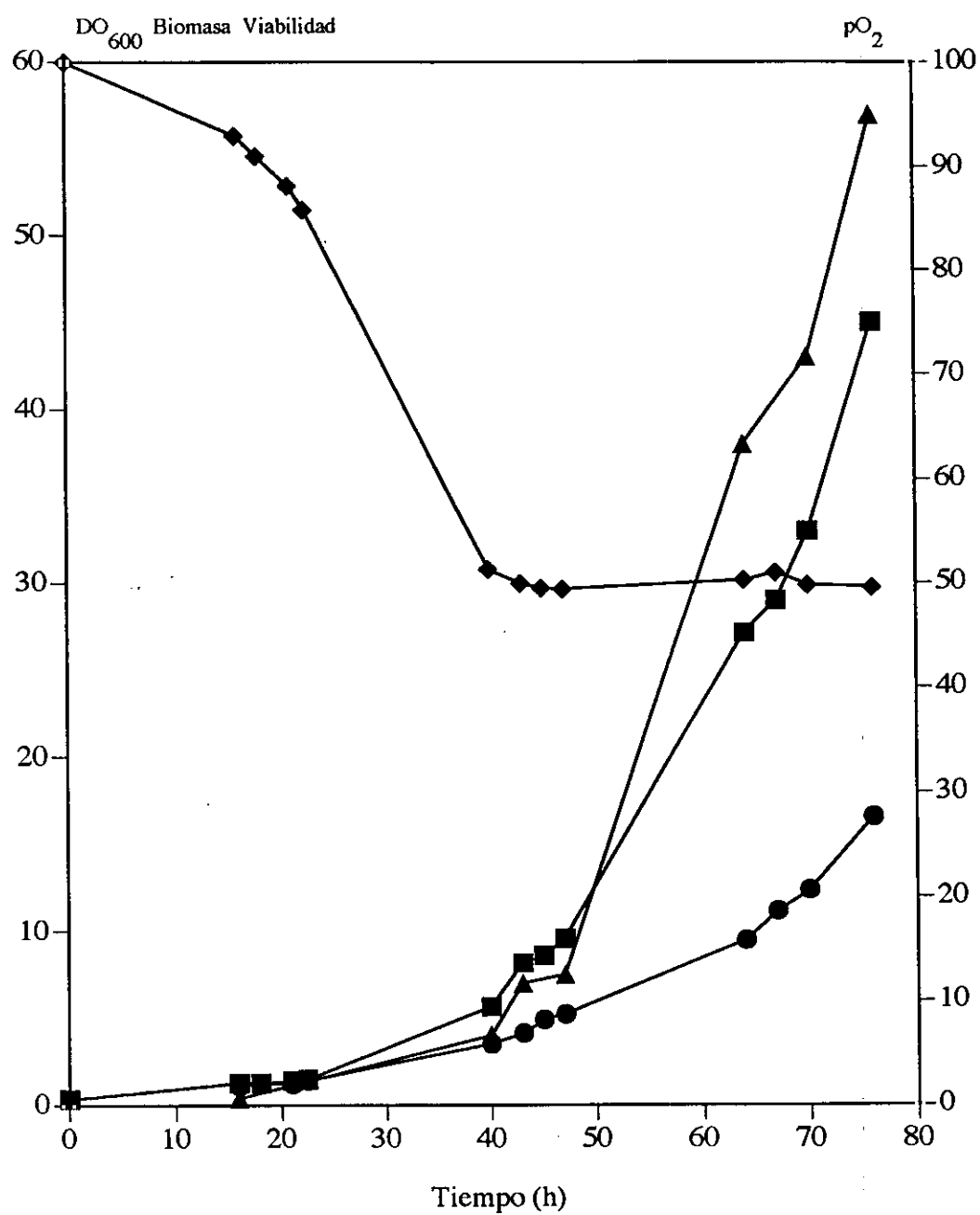
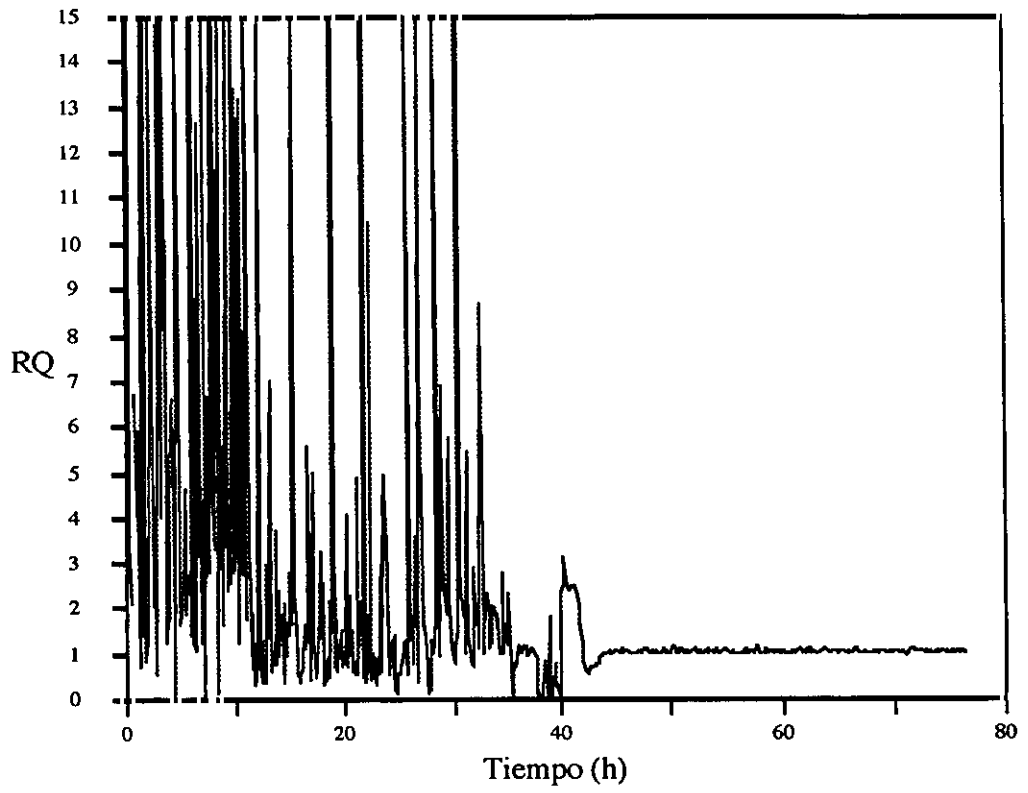
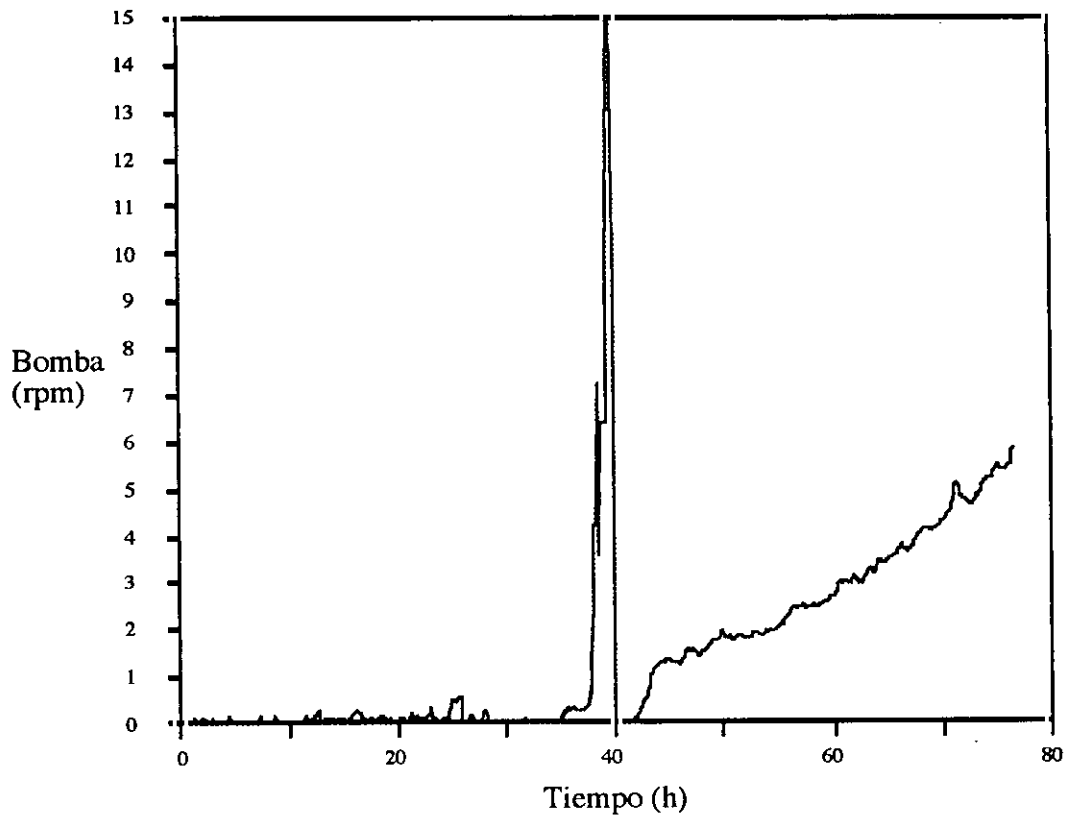


Figura 12. Cepa LD1 crecida en cultivo alimentado en fermentador a 24°C en medio sintético. Perfiles de cociente respiratorio (panel A) y alimentación de medio de cultivo fresco (panel B).

A



B



incrementándose la densidad óptica, la biomasa y la viabilidad del cultivo (Fig. 11). La tasa de crecimiento del cultivo era de $\mu = 0.063 \text{ h}^{-1}$, el nivel de biomasa final fue de 20 g/l y la viabilidad de 5.7×10^8 cél/ml para una densidad óptica de 45 (Fig. 11). El cultivo se detuvo, por razones técnicas, en plena fase exponencial, indicando el perfil del RQ y de la bomba dosificadora, que se mantenían constante y en aumento respectivamente, la posibilidad de continuar el crecimiento una generación más alcanzando los 40 g/l de biomasa y las 100 unidades de densidad óptica. En resumen la cepa LD1 crece con una buena viabilidad en este medio con el único inconveniente de una larga fase de latencia.

1.2.1.2. Crecimiento en medio complejo.

La misma cepa fue crecida a continuación en idénticas condiciones utilizando un medio complejo. Los resultados se presentan en las figuras 13 y 14. Tras la inoculación, la densidad óptica inicial fue de 0.5, observándose una fase de latencia menor que en el caso anterior de sólo 15 h, con una tasa de crecimiento 2.5 veces mayor ($\mu = 0.154 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 13). El inicio de la fase exponencial a las 15 h (Fig. 13) coincide con la estabilización del cociente respiratorio que se traduce en ese instante en un aporte creciente de medio por parte de la bomba dosificadora de medio (Fig. 14). La fase exponencial de crecimiento se mantiene durante 20 h hasta densidad óptica en torno a 100 (Fig. 13); en ese momento se observa una disminución en el aporte de medio de cultivo (Fig. 14), con parada del crecimiento exponencial. Los valores obtenidos con este medio eran 39 g/l de biomasa, 9×10^8 cél/ml con una densidad óptica en torno a 100 (Fig. 13). La conclusión más importante de este experimento fue la mayor rapidez de crecimiento de la cepa en este medio, con una fase de latencia inferior a la mitad alcanzándose de forma reproducible un nivel de biomasa medio-alto (40 g/l), con una alta viabilidad, demostrándose la adaptación de esta cepa a estas condiciones de crecimiento en fermentación alimentada. La mayor rapidez de crecimiento era un factor importante en la expresión del fenotipo lítico, como se mencionó con anterioridad, ya que su expresión es dependiente del mismo (Torres *et al.*, 1991).

1.2.2. Estudio de la capacidad y velocidad de crecimiento de la cepa LD1 transformada con el plásmido pCH100L.

Una vez demostrada la capacidad de crecimiento de la cepa LD1, y seleccionado el medio de cultivo procedimos a estudiar la capacidad de crecimiento de la cepa transformada con el plásmido pCH100L, para comprobar la adaptación fisiológica de la cepa al plásmido (Gellissen *et al.*, 1992) en esas condiciones de trabajo, y calcular la estabilidad del plásmido, al tratarse de un medio de cultivo en el que no se aplica presión selectiva para el mantenimiento del plásmido.

El preinóculo de estos cultivos se realizó en medio sin leucina, es decir con presión selectiva para el mantenimiento del plásmido, con el fin de asegurar el máximo número de células viables portadoras de plásmido en el momento de la inoculación del fermentador. Los datos de este experimento se muestran en las figuras 15 y 16. Tras una fase de latencia corta de 10-15 h se inicia la fase exponencial de crecimiento que se mantiene hasta alcanzar niveles de densidad óptica 115, con biomasa de 45 g/l y viabilidad de 9×10^8 cél/ml (Fig. 15), valores similares a los obtenidos en la cepa sin transformar (Fig. 13). La tasa de crecimiento fue $\mu = 0.138 \text{ h}^{-1}$, similar a

Figura 13. Cepa LD1 crecida en cultivo alimentado en fermentador a 24°C, en medio complejo. Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (▲), número de células viables, 10^7 cél/ml; (●), biomasa del cultivo en g/l; (◆), presión de oxígeno en el cultivo.

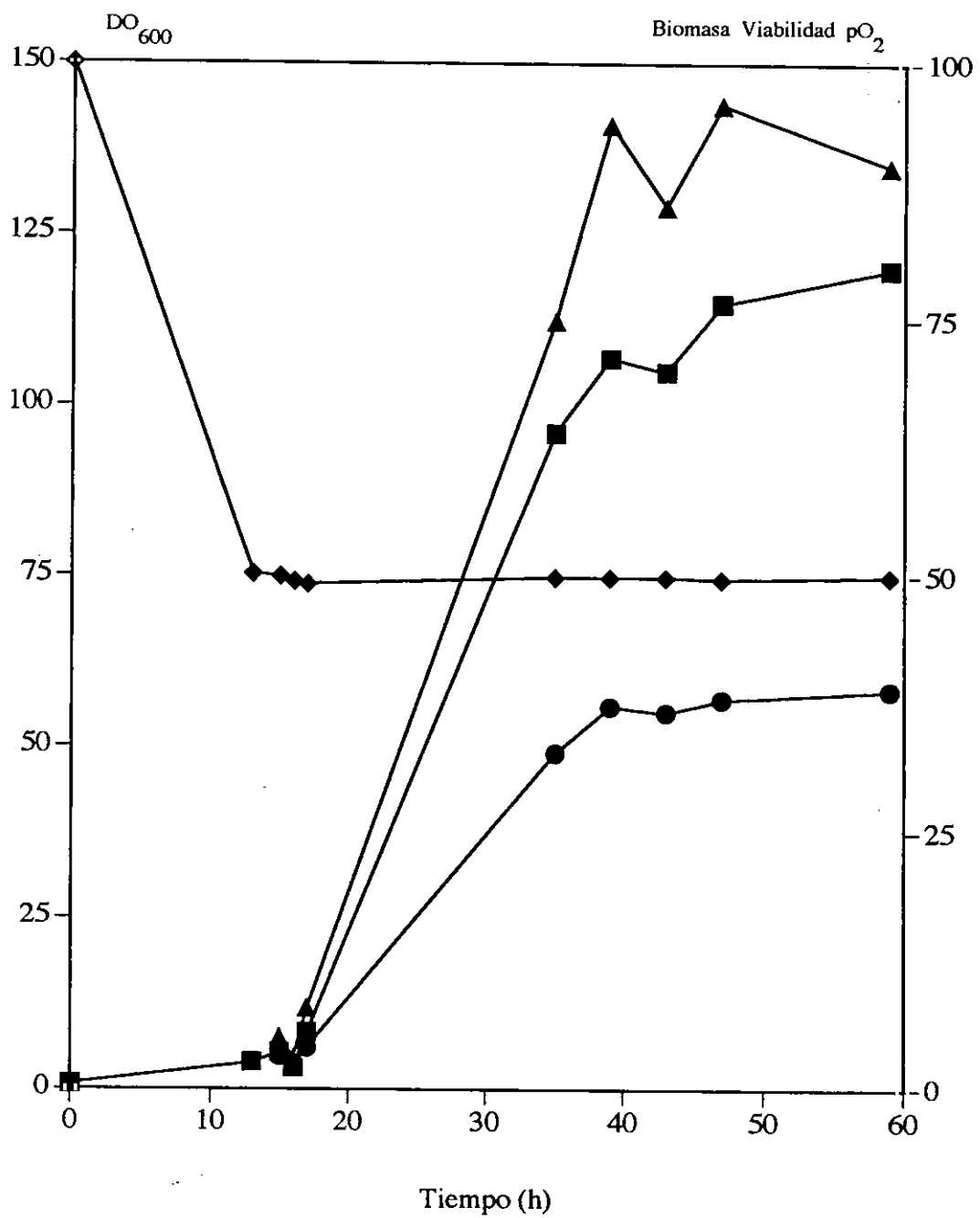
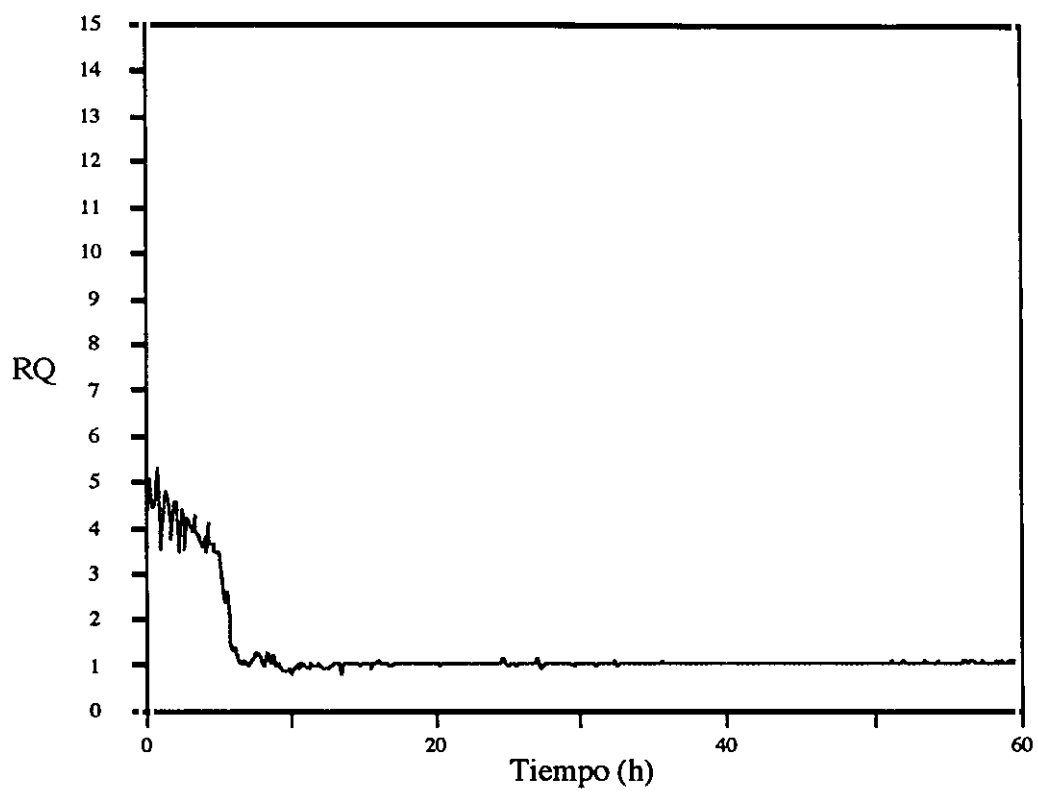
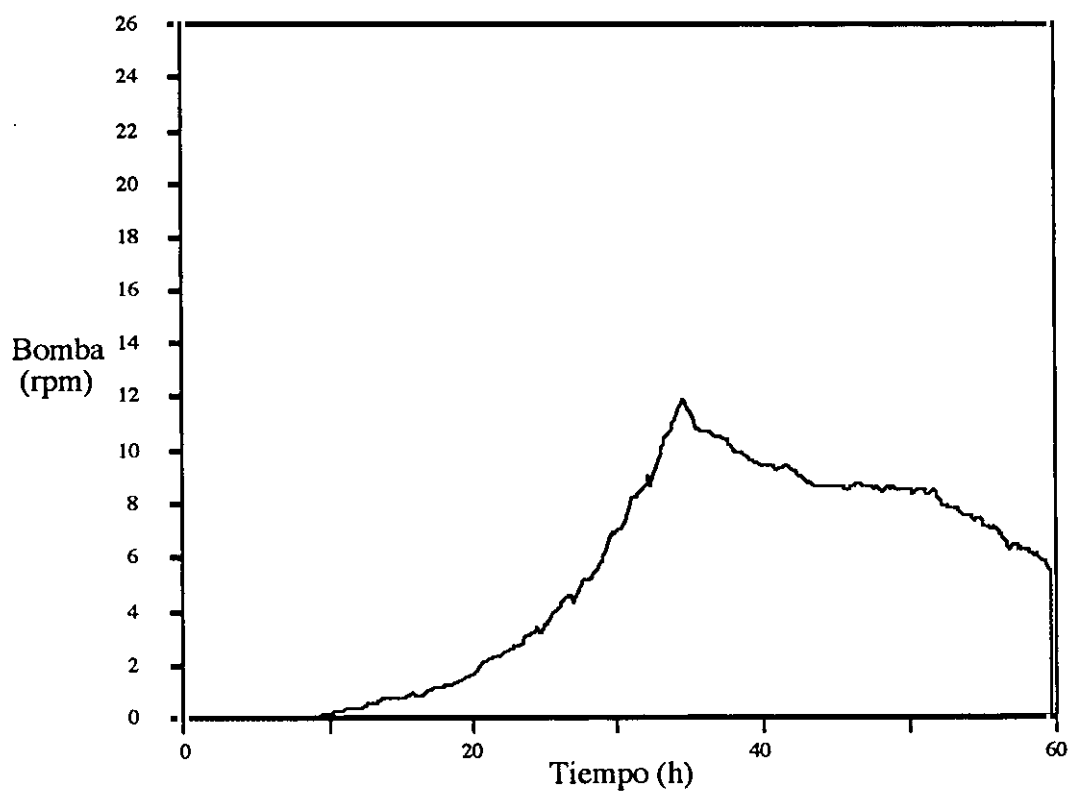


Figura 14. Cepa LD1 crecida en cultivo alimentado en fermentador a 24°C, en medio complejo. Perfiles de cociente respiratorio (panel A) y alimentación de medio de cultivo fresco (panel B).

A



B



la de la cepa silvestre por lo que la presencia del plásmido no alteraba la velocidad de crecimiento de la cepa en estas condiciones.

Para calcular la estabilidad del plásmido a lo largo del cultivo evaluamos el número de células que crecían en medio mínimo sin leucina (portadoras de plásmido) frente a las que crecían en medio YPD, estableciendo el porcentaje de células portadoras de plásmido, a lo largo del cultivo. En la tabla VII se muestran los datos, indicando que hasta densidad óptica 65 la pérdida de plásmido no es muy acusada, detectándose niveles superiores al 75%. A partir de ese momento la disminución de células portadoras de plásmido es mayor, llegando al final del cultivo con densidad óptica 115 y un 43% de las células con plásmido. No obstante el cambio térmico a 37°C debe efectuarse en un momento de la fase exponencial que permita un crecimiento activo del cultivo; teniendo en cuenta que la máxima densidad óptica alcanzada por la cepa en estas condiciones es 100 (Fig. 15), un choque térmico deberá realizarse en torno a densidad óptica 20-30 para permitir una correcta expresión del fenotipo lítico. En ese momento del cultivo, el porcentaje de células portadoras de plásmido ronda aproximadamente el 80%, con densidad óptica 12 es del 85% y a densidad óptica 65 es del 78% (Tabla VII), lo que es un porcentaje aceptable para realizar el choque térmico con garantías de recuperar una buena cantidad de CAT en el medio de cultivo.

1.2.3. Efecto de un choque térmico en un cultivo de LD1/pCH100L creciendo en fermentación alimentada.

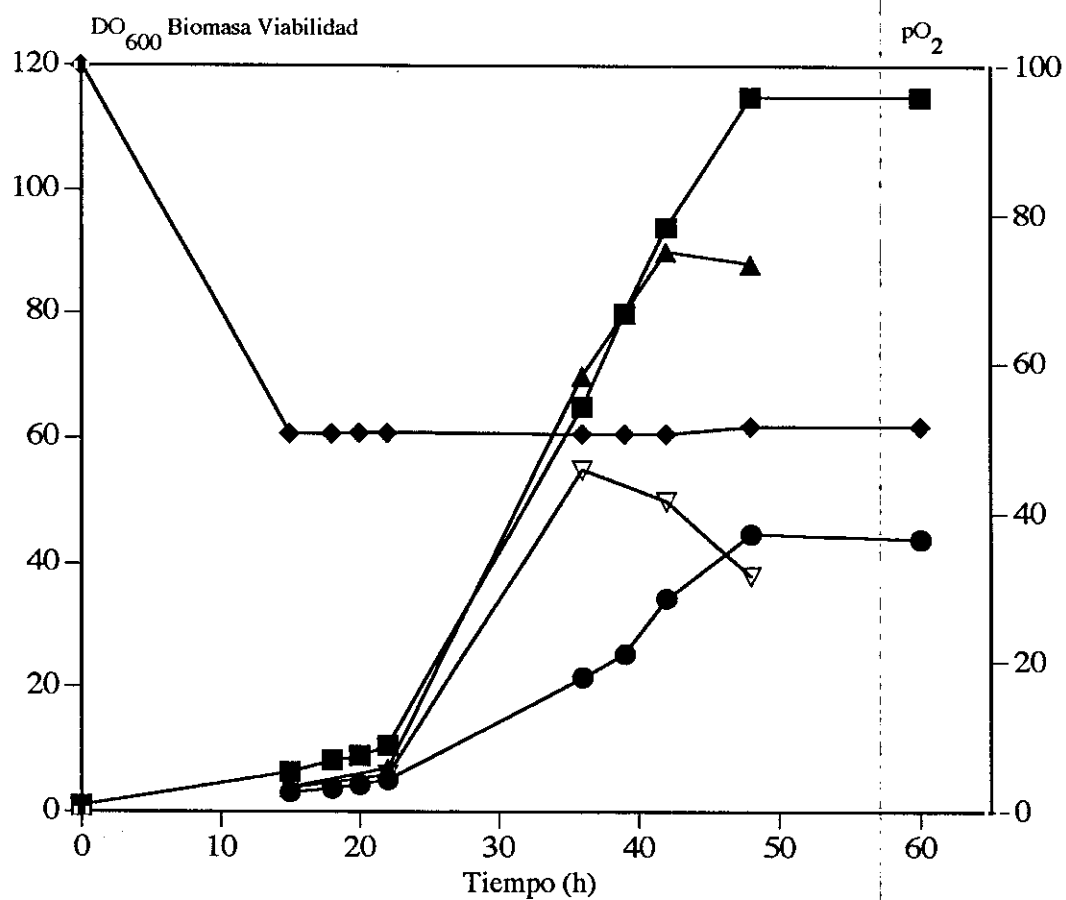
Los resultados previos de velocidad de crecimiento y estabilidad del plásmido indicaban la posibilidad de realizar la fermentación con choque térmico en medio complejo.

El preinóculo del fermentador creció en medio deficiente en leucina, con presión selectiva, para asegurar el máximo porcentaje de células portadoras de plásmido en el inicio del cultivo. Los datos del fermentador se muestran en las figuras 17 y 18. En la fase inicial del cultivo a 24°C, tras una fase de latencia de unas 15 h, se observaba una estabilización del cociente respiratorio, con inicio de adición de medio fresco al cultivo (Fig. 18), coincidente con el inicio de un crecimiento exponencial en el cultivo con incremento del nivel de biomasa en el mismo y tasa de crecimiento, $\mu=0.154 \text{ h}^{-1}$, similar a fermentadores anteriores (Fig. 17). A las 28 h de cultivo se alcanzaba una densidad óptica de 20 con una viabilidad de $1.7 \times 10^8 \text{ cél/ml}$ y biomasa de 8.9 g/l (Fig. 17). Teniendo en cuenta los datos previos de la capacidad de crecimiento a 24°C, la densidad óptica 20 parecía el momento adecuado para realizar el cambio térmico a 37°C, ya que todavía hay posibilidad de crecimiento activo en el cultivo, como lo indican los perfiles de cociente respiratorio y de alimentación de medio (Fig. 18), para que tenga lugar la expresión del fenotipo lítico de la cepa LD1; en ese momento, el 82% de las células del cultivo eran portadoras del plásmido pCH100L.

Sin embargo, tras el cambio térmico, no se observaba una correcta expresión del fenotipo lítico, ya que la viabilidad del cultivo a las 12 h del cambio térmico (40 h de cultivo) era del 80% (Fig. 17), tomando como valor de referencia el valor a 24°C en el momento del cambio de temperatura. El comportamiento de este mutante a 37°C determina, que tras el cambio de temperatura, se produzca un desajuste del cociente respiratorio, (Fig. 18), lo que detiene el aporte

Figura 15. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo alimentado a 24°C, en medio complejo. Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (▲), número de células viables, 10^7 cél/ml; (▽), número de células viables en medio mínimo sin leucina, 10^7 cél/ml; (●), biomasa del cultivo en g/l; (◆), presión de oxígeno en el cultivo.

Tabla VII. Estabilidad del plásmido pCH100L en la cepa LD1, crecida en fermentación alimentada a 24°C.



DO ₆₀₀	YPD§	MM Leu ⁻ §	% células con plásmido
6.4	0.4	0.38	95
12	0.7	0.6	85
65	7	5.5	78
94	9	5	55
115	8.8	3.8	43

§ Número de células expresado como 10⁸ cél/ml

Figura 16. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo alimentado a 24°C, en medio complejo. Perfiles de cociente respiratorio (panel A) y alimentación de medio de cultivo fresco (panel B).

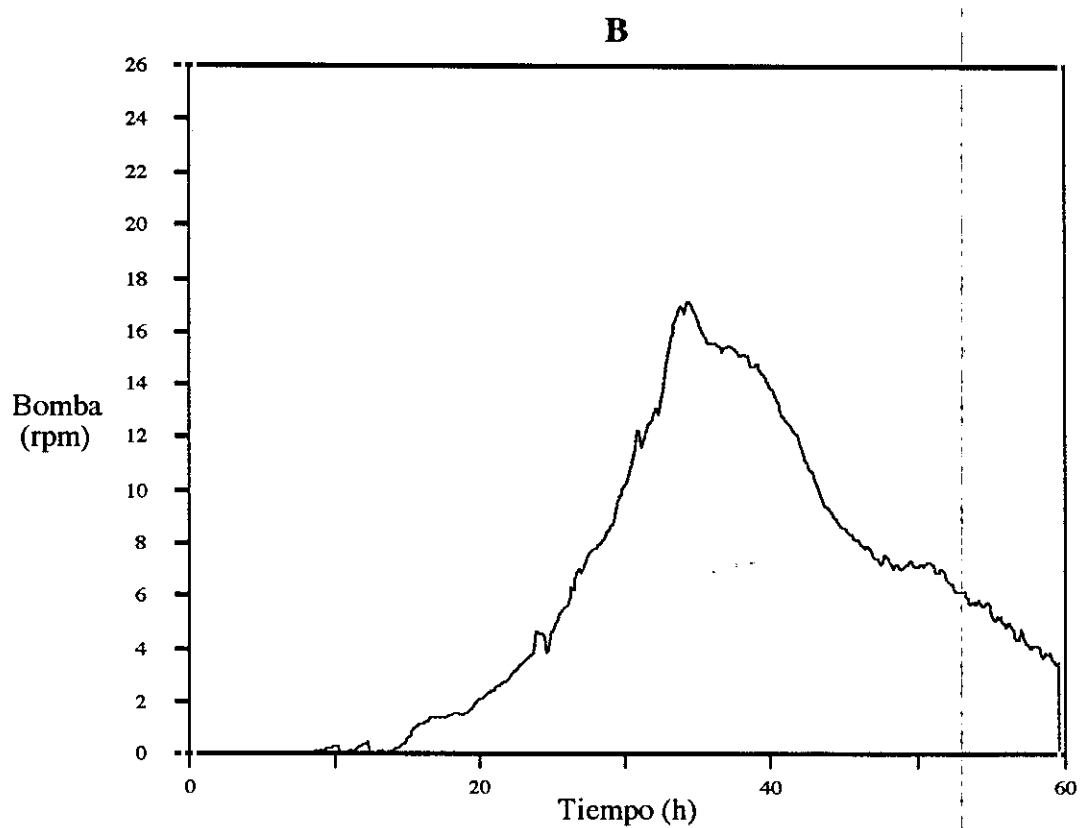
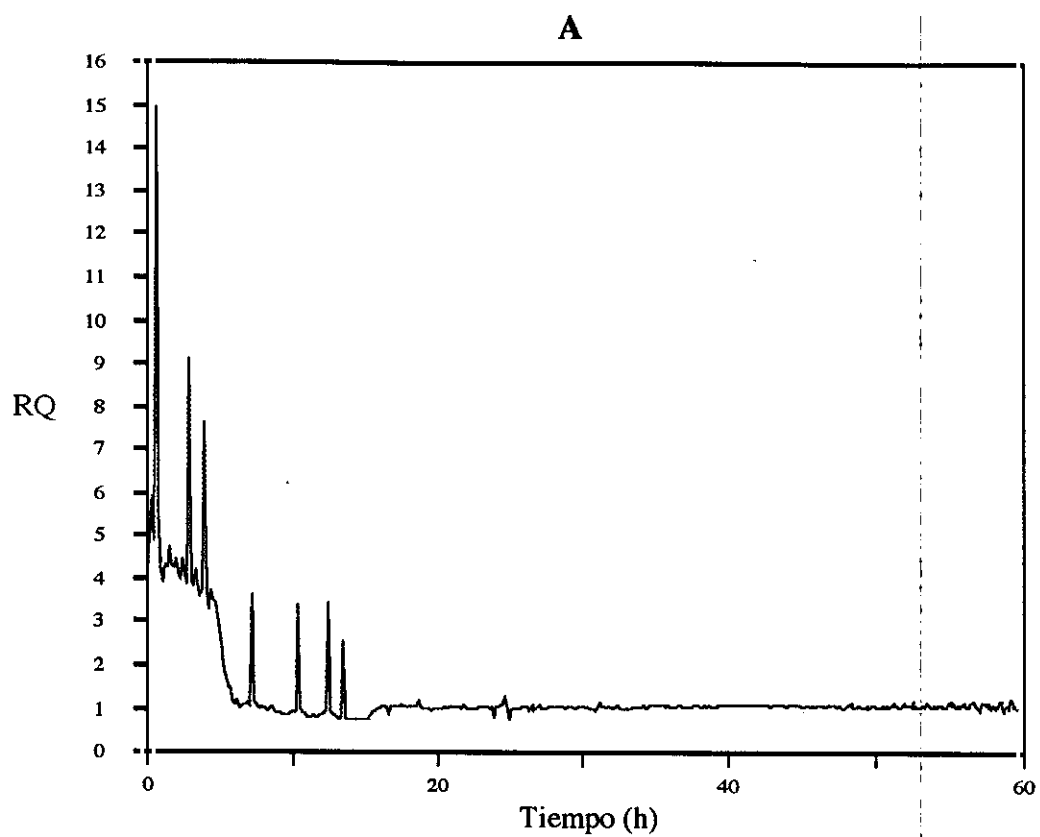


Figura 17. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo alimentado a 24°C, en medio complejo, con cambio térmico a 37°C. Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (▲), número de células viables, 10^7 cél/ml; (●), biomasa del cultivo en g/l; (◆), presión de oxígeno en el cultivo; la línea vertical representa el cambio a 37°C.

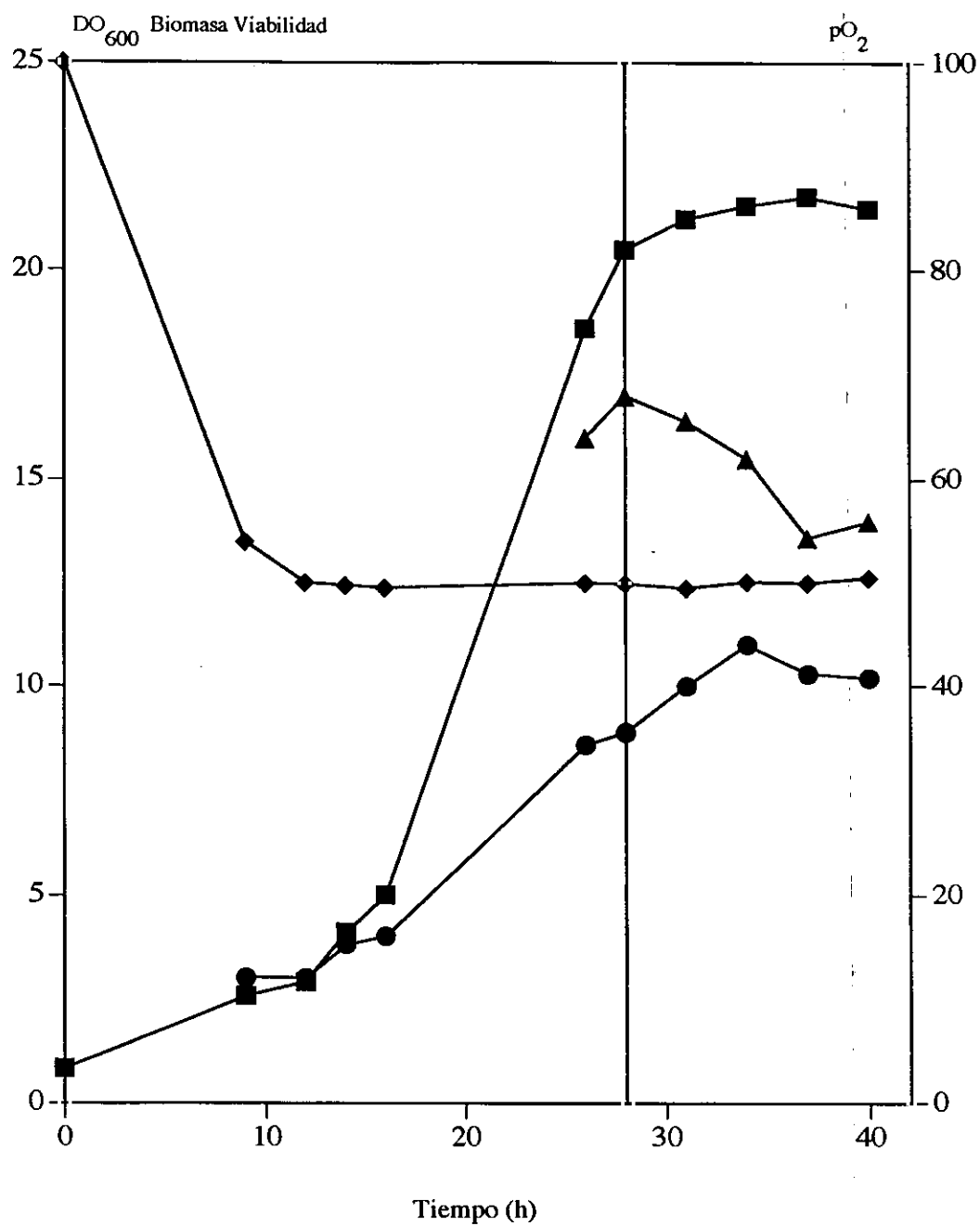


Figura 18. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo alimentado a 24°C, en medio complejo, con cambio térmico a 37°C. Perfiles de cociente respiratorio (panel A) y alimentación de medio de cultivo fresco (panel B).

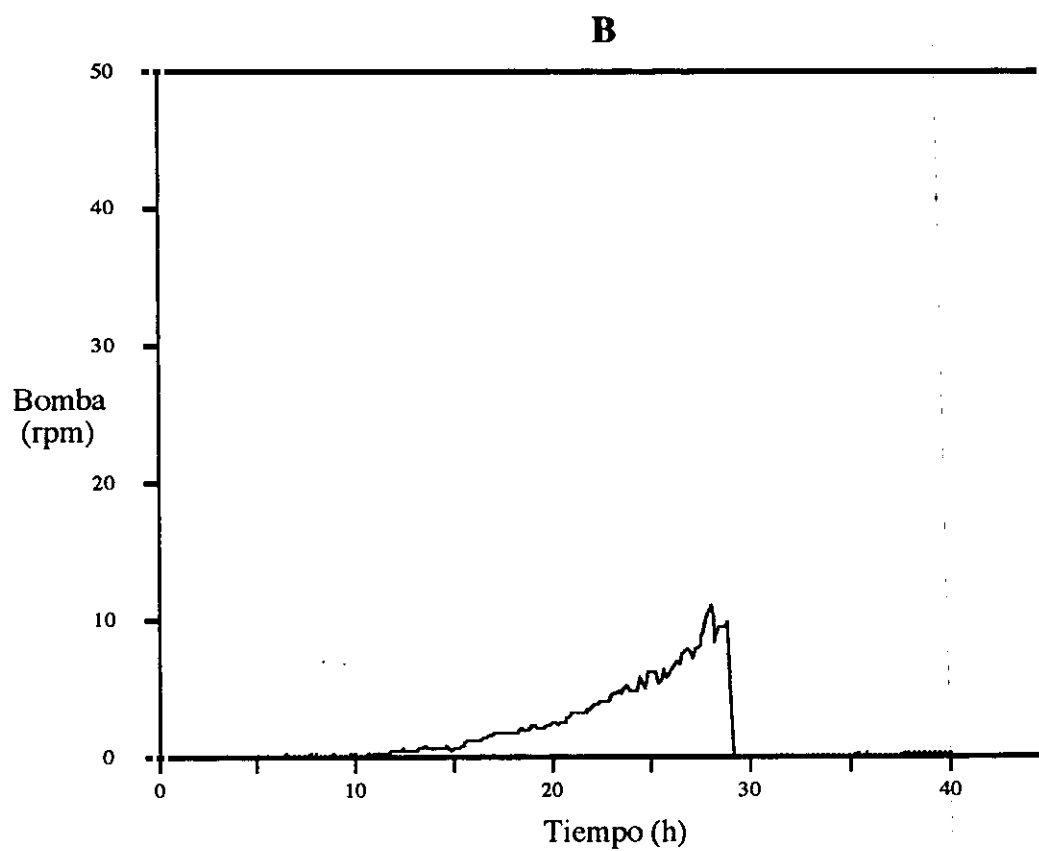
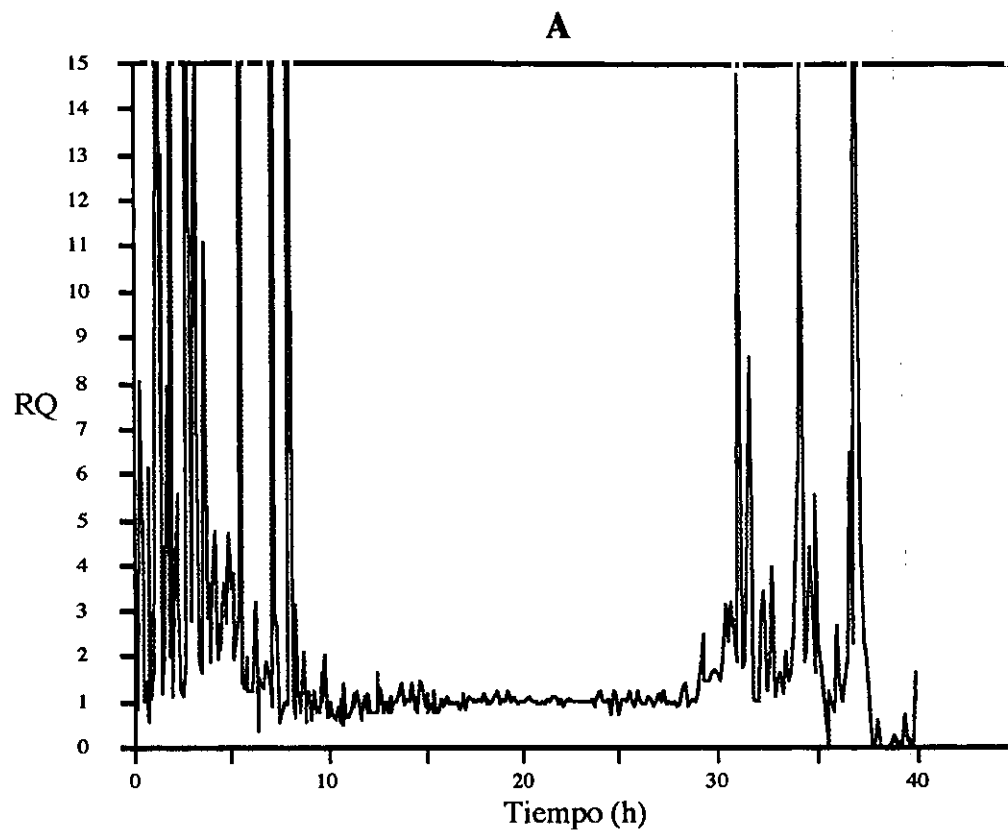
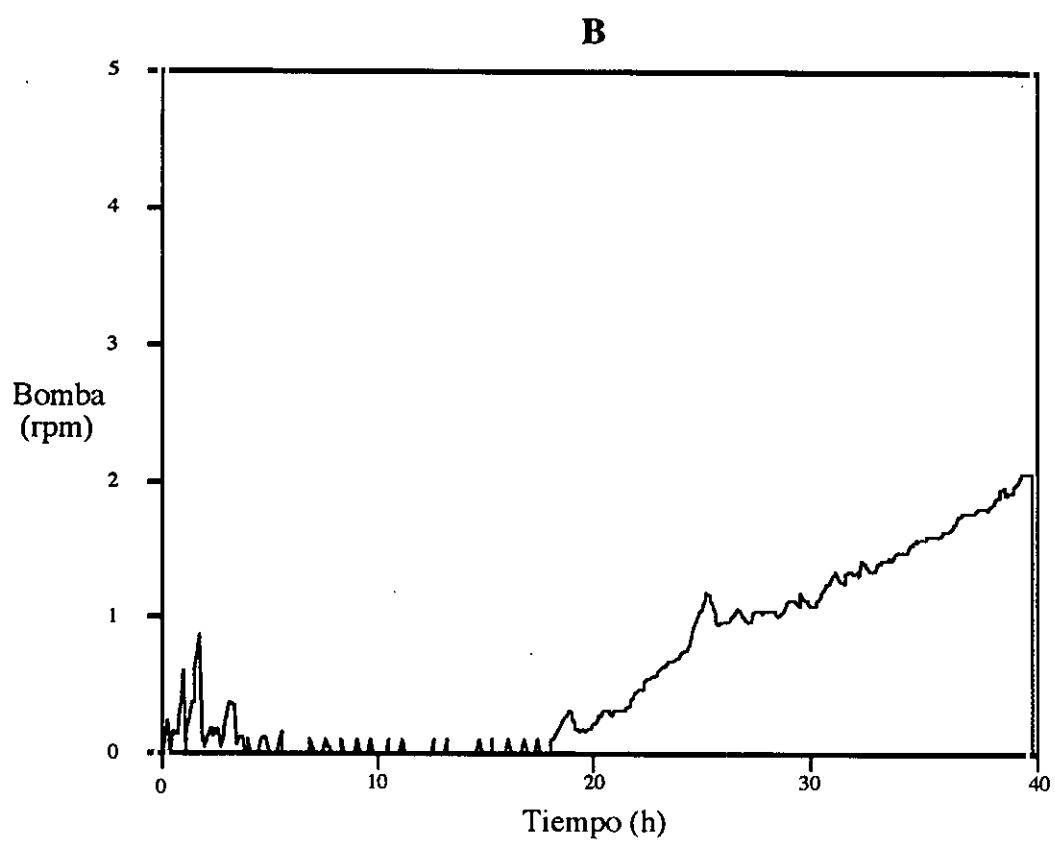
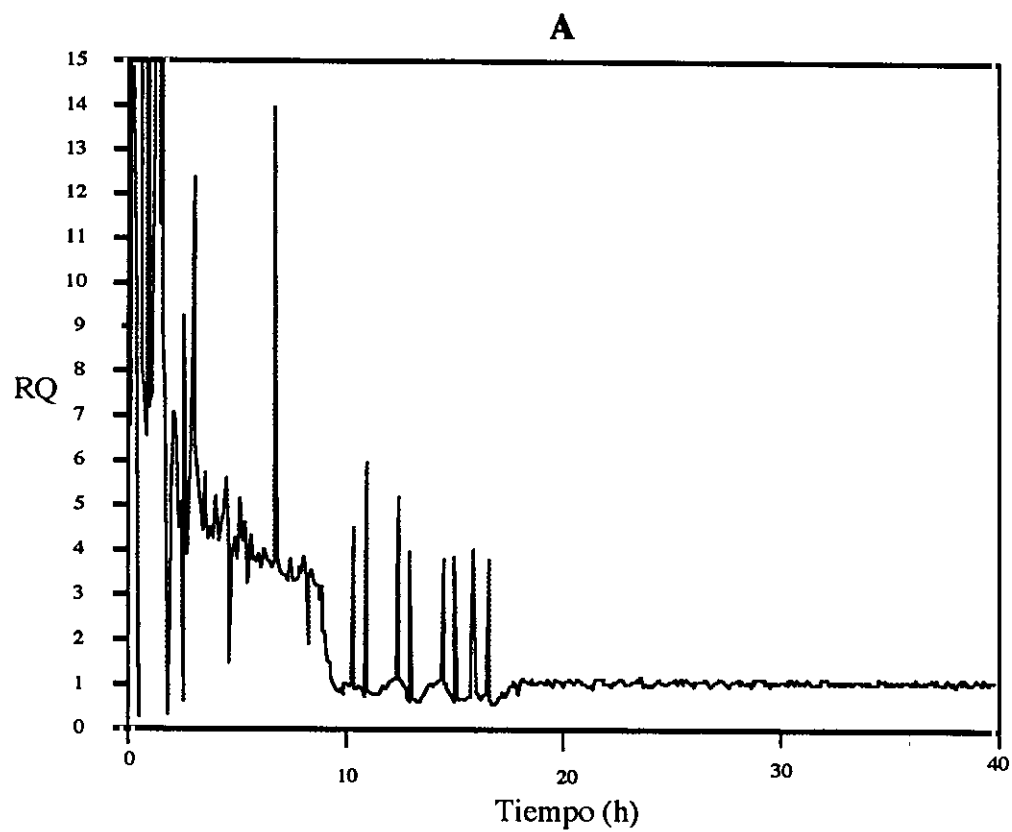


Figura 19. Cepa LD1/pCH100L crecida en cultivo alimentado a 24°C, en medio complejo. Perfiles de cociente respiratorio (panel A) y alimentación de medio de cultivo fresco (panel B).



de medio de cultivo al fermentador, provocando que no pueda mantenerse el crecimiento, y por tanto no se exprese el fenotipo lítico que es dependiente de la presencia de crecimiento activo en el fermentador.

Se mantuvo un fermentador control paralelo inoculado con las mismas células, a 24°C todo el tiempo, en el cual el cociente respiratorio no sufre alteración, manteniéndose en aumento el aporte de nutrientes al fermentador por parte de la bomba (Fig. 19), frente a lo observado en el fermentador con cambio de temperatura (Fig. 18).

2. DESARROLLO DE CEPAS LÍTICAS DE *S. cerevisiae* DEFICIENTES EN PROTEASAS. LIBERACIÓN Y ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.

2.1. Obtención de mutantes autolíticos de *S. cerevisiae* deficientes en proteasas.

Los resultados previos indicaban una inestabilidad en las actividades enzimáticas de CAT y también de fosfatasa alcalina cuando eran liberadas al medio de cultivo, probablemente debida a la presencia en el medio de proteasas liberadas durante el proceso de lisis que producían una proteólisis inespecífica. Estas observaciones justificaban el desarrollo de cepas autolíticas deficientes en proteasas. En *S. cerevisiae* las proteasas vacuolares son las responsables de los fenómenos de proteólisis inespecífica. El control de la producción y maduración de dichas proteasas es realizado en una reacción en cascada por la proteasas A y B, codificadas respectivamente por los genes *PEP4* y *PRB1* (Hirsch *et al.*, 1989). Por lo tanto, la eliminación de dichos genes supondría la reducción de la proteólisis inespecífica causada por las proteasas de origen vacuolar. Para obtener mutantes autolíticos deficientes en ambos genes de proteasas solicitamos a la colección de cepas de levadura "Yeast Stock Center" las cepas BJ5461 y BJ5464, dos cepas haploides, mutadas en los genes *PEP4* y *PRB1*.

Para obtener cepas autolíticas deficientes en proteasas seguimos dos estrategias:

- cruces genéticos de cepas autolíticas (*slt2D35*), concretamente L3c34a y L3c36c, portadoras de la misma mutación que la cepa diploide LD1 empleada con anterioridad, con las mencionadas BJ5461 y BJ5464 deficientes en proteasas.
- interrupción del gen *SLT2* en la cepa BJ5464.

El uso de ambas estrategias se justificaba debido a que resultados previos en nuestro laboratorio demostraban la importancia del fondo genético presente en la levadura en la expresión del fenotipo lítico, acentuándolo o disminuyéndolo; por ello es necesario evaluar todos los mutantes obtenidos, eligiendo el que presente mejor expresión del fenotipo autolítico.

2.1.1. Uso de cruces genéticos.

Se realizaron cruces genéticos entre las cepas de tipo sexual opuesto seleccionando los diploides en medios selectivos, basándonos en las auxotrofías de los mismos:

- L3c34a x BJ5461, en medio mínimo suplementado sólo con leucina.
- L3c36c x BJ5464, en medio mínimo suplementado sólo con leucina y uracilo.

Se indujo la esporulación de los diploides por crecimiento sucesivo en medios de preesporulación y de esporulación, procediéndose a la disección de las ascas, obteniéndose 23 ascosporas.

2.2. Análisis del fenotipo *slt2* en las ascosporas.

A continuación, se procedió a la caracterización fenotípica de las ascosporas obtenidas, realizando diversas pruebas de crecimiento en placa con el objeto de seleccionar primero las portadoras del fenotipo lítico *slt2*. La batería de pruebas a realizar con las ascosporas obtenidas fue:

- Sensibilidad a concentraciones 12 mM de cafeína a 24°C.
- Capacidad de crecimiento y lisis a 37°C en placas con BCIP.
- Complementación por estabilización osmótica con sorbitol 1 M de la lisis inducida por cafeína (12 mM) y por temperatura (37°C).

En toda la batería de pruebas se emplearon como cepas control la cepa BJ5464 (*SLT2*) y la L3c36c (*slt2*), dos de las cepas parentales.

2.2.1. Sensibilidad de las ascosporas a concentraciones 12 mM de cafeína.

Los mutantes *slt2* son incapaces de crecer a 24°C en presencia de concentraciones 12 mM de cafeína, debido a la lisis que la presencia de dicha sustancia produce en las células. Por ello sembramos las ascosporas obtenidas en placas de YPD con cafeína y se incubaron a 24°C el tiempo necesario, incubando al mismo tiempo una placa control de YPD a la misma temperatura. Los resultados se muestran en la figura 20 donde en la placa con cafeína (panel A), se observa que las ascosporas 1c, 4a, 8b, 9a, 9b y 11c son sensibles a cafeína y por tanto probablemente sean mutantes *slt2*. En la placa control, todas las ascosporas crecen normalmente (panel B).

2.2.2. Capacidad de crecimiento y lisis a 37°C .

El BCIP es un sustrato para la enzima intracelular fosfatasa alcalina, la lisis de las células a 37°C libera dicha enzima produciendo la hidrólisis del BCIP, apareciendo las colonias de color azul-verdoso, permaneciendo con la coloración normal en el caso contrario. Además dependiendo del fondo genético, aunque en todos los casos se produzca lisis celular los mutantes *slt2* pueden o no crecer a 37°C.

Sembramos dos placas de YPD con BCIP, y se incubaron a 37°C y 24°C. Los resultados de la figura 21 demuestran que a la temperatura de 37°C (panel A) algunas ascosporas eran incapaces de crecer (1c, 9b, 11c) y otras crecían con coloración azul-verdosa (8b, 9a, 11a) siendo ambos tipos de ascosporas probables mutantes *slt2*; en el panel B de la figura aparece la placa incubada a 24°C donde todas las ascosporas crecían con normalidad sin lisis. Todas las ascosporas sensibles al choque térmico, enumeradas anteriormente, fueron también sensibles a cafeína, con

Figura 20. Inhibición del crecimiento por cafeína de las ascosporas obtenidas en el cruce genético de las cepas L3c34a con BJ5461, y L3c36c con BJ5464. Panel A, YPD con 12 mM de cafeína; panel B, YPD. La temperatura de crecimiento fue de 24°C.

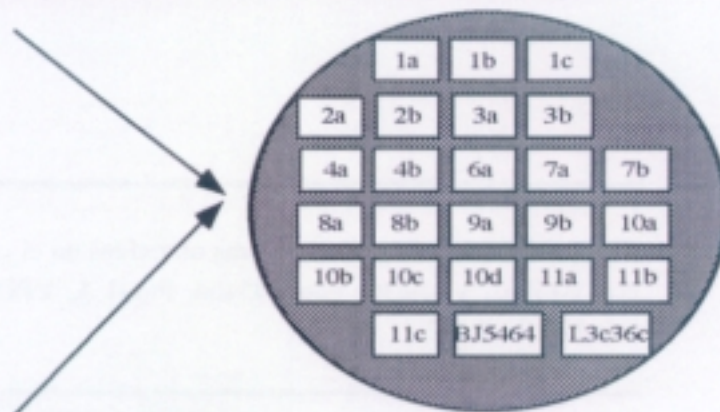
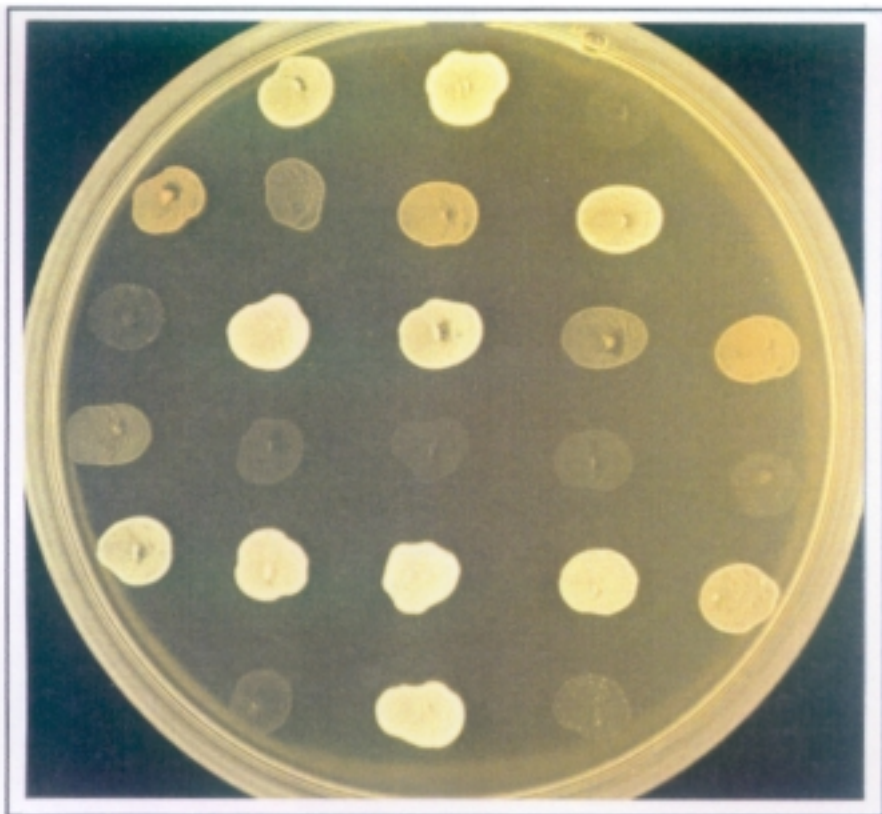
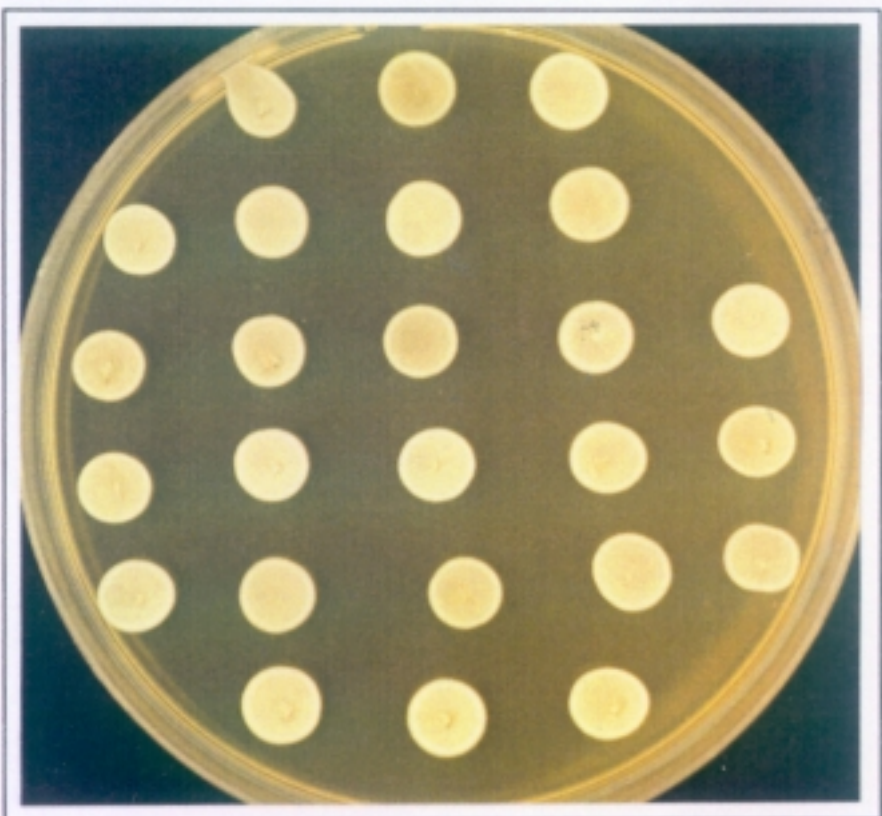
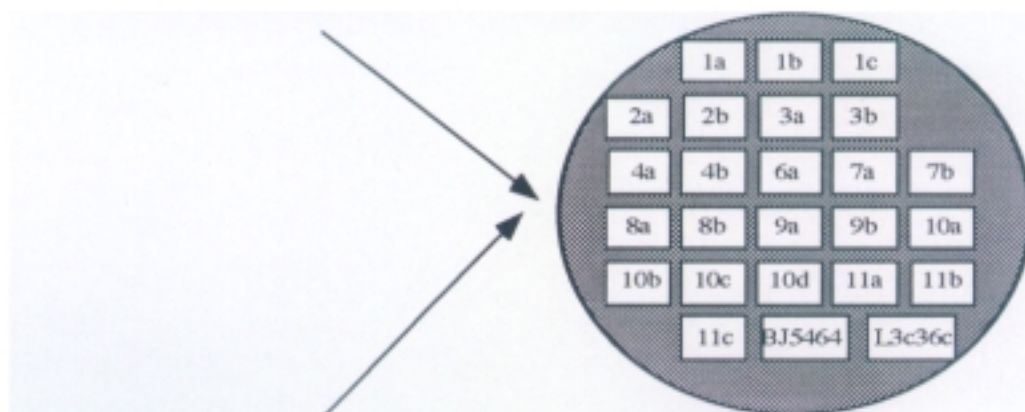
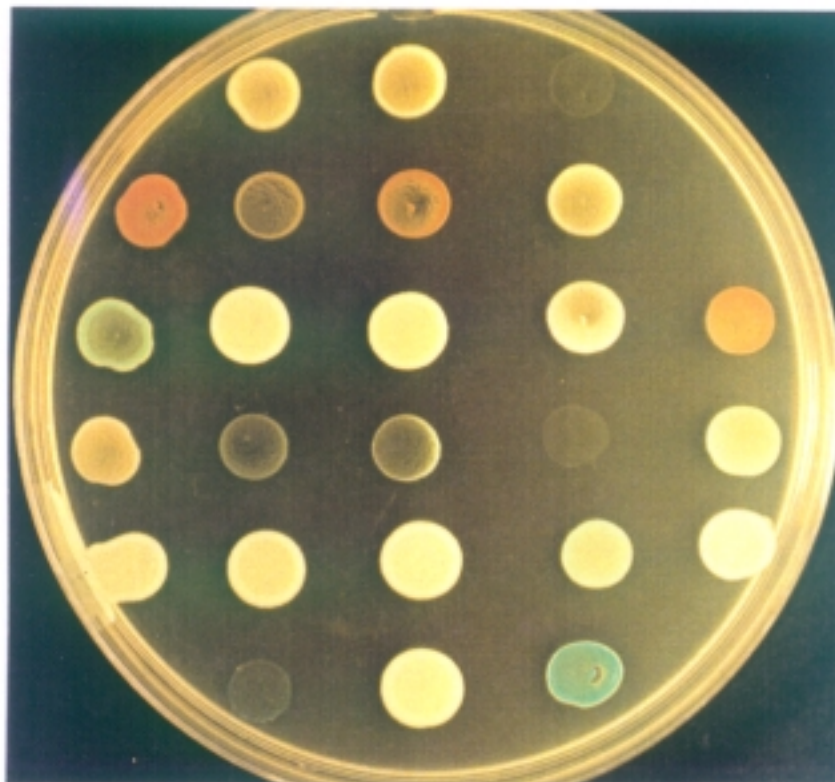
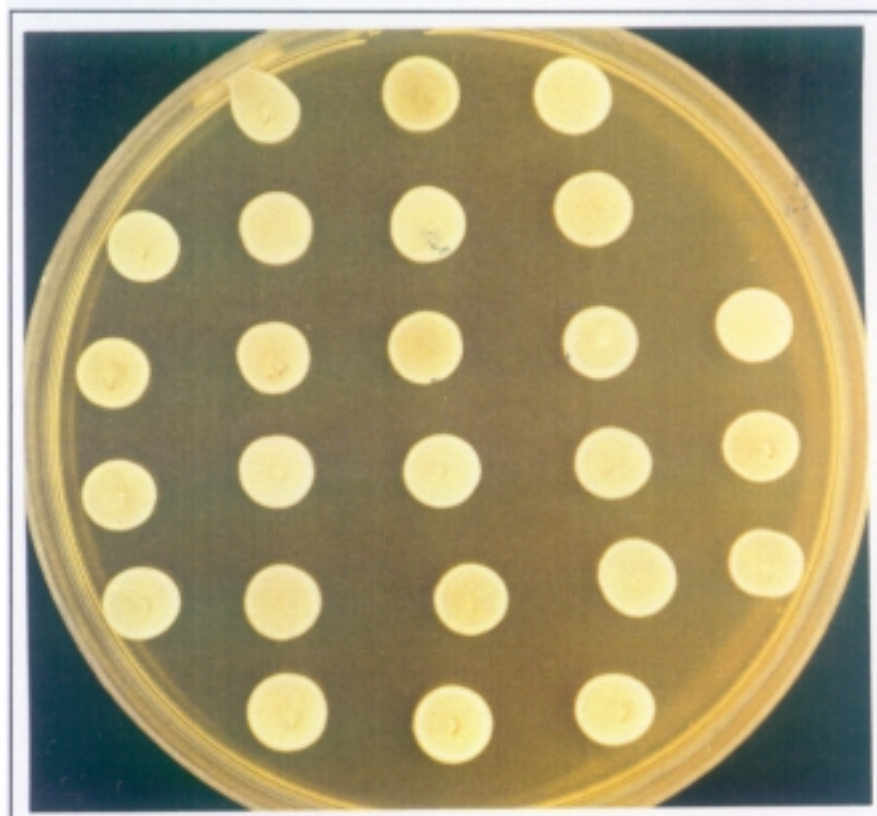
A**B**

Figura 21. Lisis de las ascosporas obtenidas en el cruce genético de las cepas L3c34a con BJ5461, y L3c36c con BJ5464. Panel A, YPD con BCIP a 37°C; panel B, YPD con BCIP a 24°C.

A**B**

excepción de la ascospora 11a que crecía en cafeína (Fig. 20, panel A), lo que hizo que fuera descartada para posteriores estudios; en cambio, la ascospora 10a que no crecía en cafeína (Fig. 20, panel A) fue descartada ya que a 37°C no presentaba lisis celular (Fig. 21, panel A), la ausencia de crecimiento en cafeína puede ser debido a una mayor sensibilidad de la cepa frente a ese compuesto, por otras causas diferentes a las de la mutación en el gen *SLT2*.

2.2.3. Estabilización osmótica de la lisis producida por cafeína (12 mM) y por temperatura (37°C).

El fenotipo *slt2* se caracteriza por producir lisis en las células debido a la formación de una pared celular osmóticamente inestable, por lo que la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de cultivo evita la lisis y restaura la capacidad de crecimiento de las células (Torres *et al.*, 1991). El estabilizador osmótico elegido fue el sorbitol, en una concentración 1 M, observando si se eliminaba la lisis producida por cafeína y por temperatura.

Para ello, sembramos las ascosporas sensibles a cafeína (ver apdo. 2.3.1.) en placa de YPD suplementado con 12 mM de cafeína y sorbitol 1 M incubando a 24°C, y las sensibles a temperatura (ver apdo. 2.3.2) en una placa de YPD BCIP suplementada con sorbitol 1 M incubando a 37°C. En la figura 22 aparecen los resultados, en el panel A se muestra la placa de YPD-cafeína-sorbitol en la que crecen todas las ascosporas al igual que en la placa de YPD-BCIP con sorbitol (panel B), por lo que la restauración del crecimiento, por eliminación de la lisis debida a la estabilización osmótica, realizada por el sorbitol es una prueba más que nos confirma la presencia de la mutación *slt2*.

Los resultados de la batería de pruebas efectuadas se recogen en la tabla VIII, las ascosporas 1c, 4a, 8b, 9a, 9b y 11c eran mutantes *slt2*, procediéndose con ellas, por tanto, a realizar ensayos fenotípicos de actividad proteasa debida a los productos de los genes *PEP4* y *PRB1*.

2.3. Análisis de fenotipo deficiente en proteasas *PEP4* y *PRB1*.

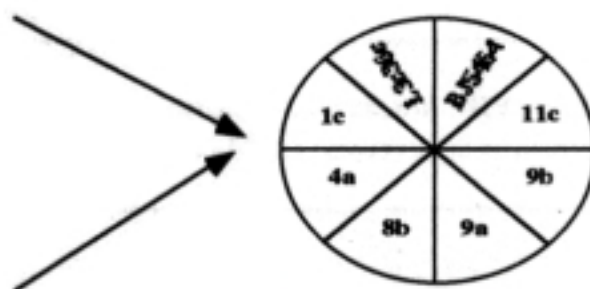
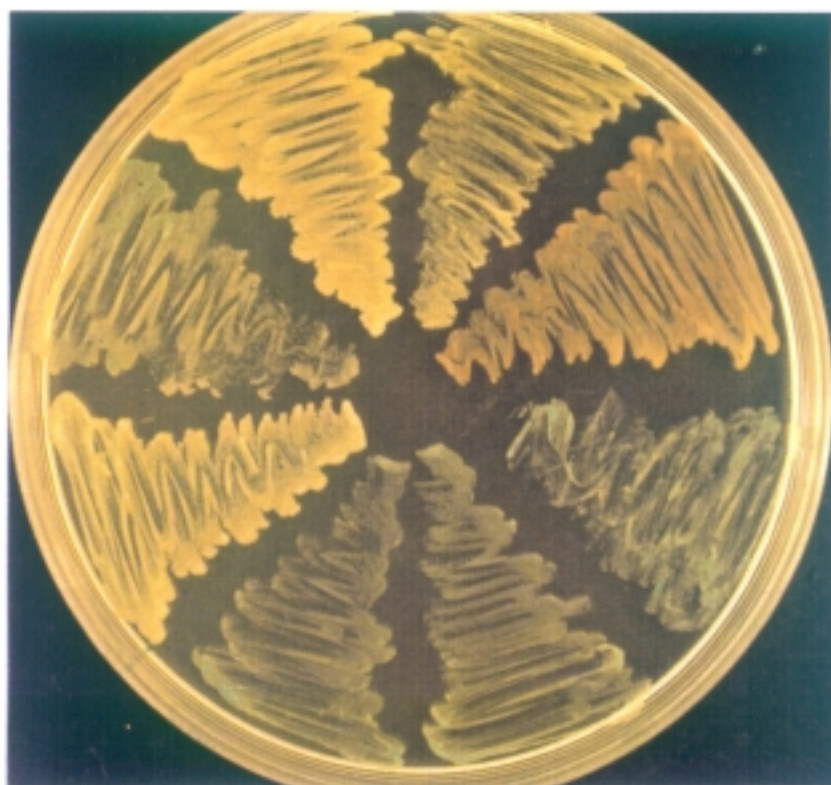
Con las ascosporas seleccionadas anteriormente se ensayó la presencia o ausencia de actividad proteasa debida a los productos de los genes *PEP4* (test APE) y *PRB1* (test HPA) (Jones *et al.*, 1991a). Los ensayos se realizan en placa según se describe en materiales y métodos (apdo. 3.5.4.) empleando para una correcta interpretación de los resultados, como cepas control, dos de las cepas parentales empleadas en los cruces genéticos: BJ5464, deficiente en ambos genes de proteasas y L3c36c, silvestre para ambos genes *PEP4* y *PRB1*.

Los resultados del test APE (Fig. 23, panel A) indicaron que las ascosporas 1c, 9b y 11c son cepas *pep4*. En los resultados del test HPA (Fig. 23, panel B) aparecía como cepa *prb1* la ascospora 11c.

En la tabla IX-A aparecen de forma conjunta los datos de ambos experimentos, apareciendo como cepa portadora de ambas mutaciones, *pep4* y *prb1*, la ascospora 11c.

Figura 22. Eliminación de la lisis por estabilización osmótica con sorbitol de las ascosporas *slt2*. Panel A, placa de YPD con 12 mM de cafeína, suplementada con sorbitol 1 M, incubada a 24°C. Panel B, placa de YPD con BCIP, suplementada con sorbitol 1 M incubada a 37°C.

A



B

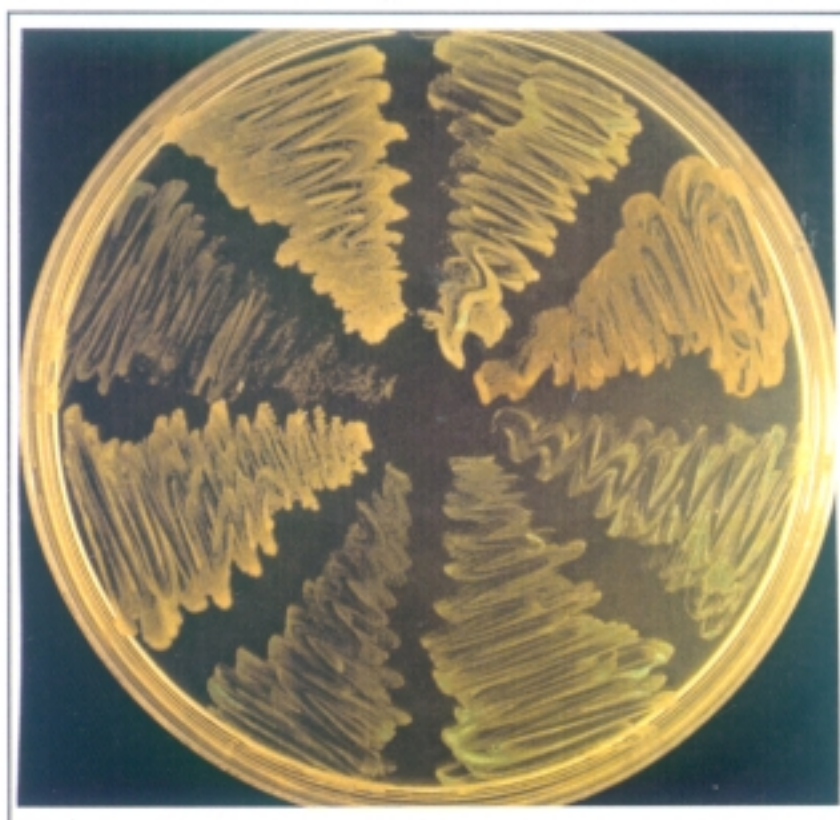


Tabla VIII. Resultados del análisis fenotípico de las ascosporas obtenidas en los cruces genéticos de las cepas L3c34a con BJ5461 y L3c36c con BJ5464.

Ascospora	YPD 12mM cafeína 24°C	YPD 12 mM cafeína 1 M sorbitol 24°C	YPD BCIP 37°C	YPD BCIP 1M sorbitol 37°C
1a	+	nd	+	nd
1b	+	nd	+	nd
1c	-	+	-	+
2a	+	nd	+	nd
2b	+	nd	+	nd
3a	+	nd	+	nd
3b	+	nd	+	nd
4a	-	+	+	+
4b	+	nd	+	nd
6a	+	nd	+	nd
7a	+	nd	+	nd
7b	+	nd	+	nd
8a	+	nd	+	nd
8b	-	+	+	+
9a	-	+	+	+
9b	-	+	-	+
10a	-	nd	+	nd
10b	+	nd	+	nd
10c	+	nd	+	nd
10d	+	nd	+	nd
11a	+	nd	+	nd
11b	+	nd	+	nd
11c	-	+	-	+
BJ5464	+	+	+	+
L3c46c	-	+	+	+

+: crecimiento

-: no crecimiento

*: lisis, color azul-verdoso

nd: no determinado

Figura 23. Análisis del fenotipo deficiente en proteasas de las ascosporas *slt2*.
Panel A, test APE; panel B, test HPA.

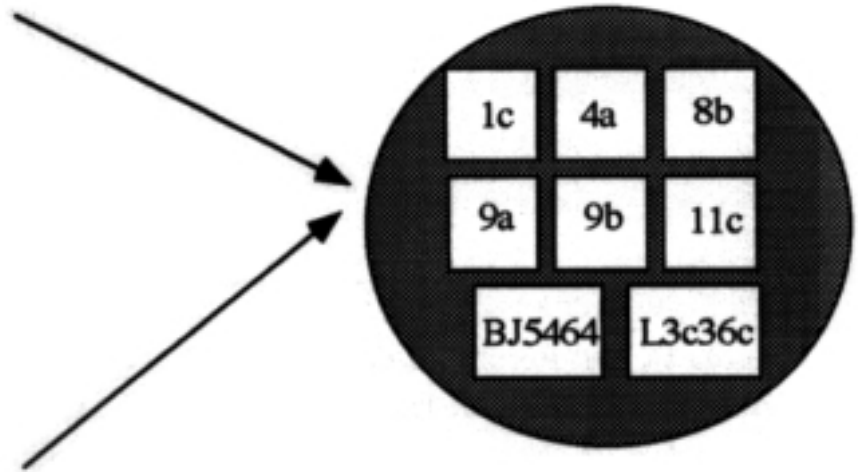
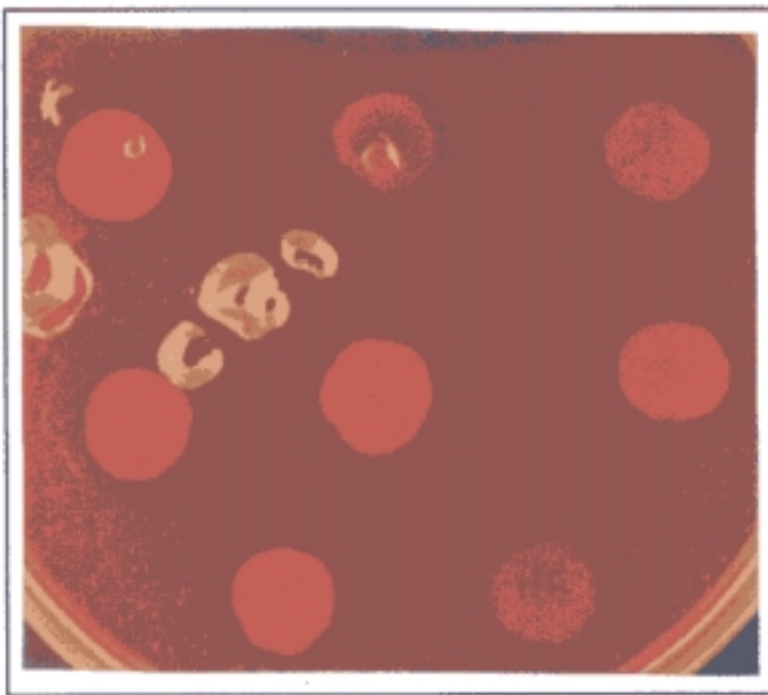
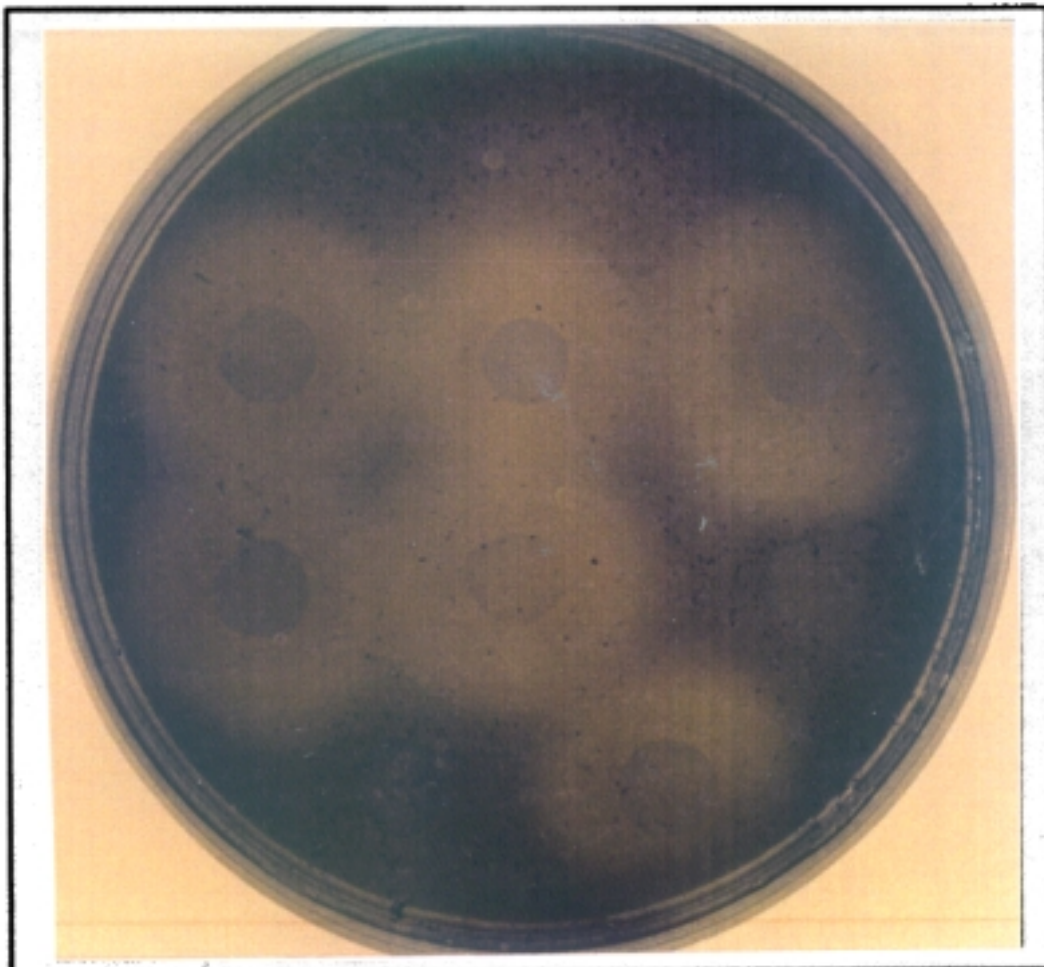
A**B**

Tabla IX. (A) Resultados de los test APE y HPA. (B) Resultados de la lisis, medida por citometría de flujo, de las ascosporas 1c, 9b, 11c y la cepa BJ5464, expresada como porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio.

A

Ascospora	Test APE (<i>pep4</i>)	Test HPA (<i>prb1</i>)
1c	-	+
4a	+	+
8b	+	+
9a	+	+
9b	-	+
11c	-	-

+: Test positivo, gen silvestre.

-: Test negativo, gen mutado

B

Ascospora	YPD 24°C§	YPD 37°C§	YPD 37°C Sorbitol 1M§
1c	16	76	23
9b	22	71	18
11c	5	88	2
BJ5464	5	2	1

§: Células lisadas, expresadas como porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio, medidas por citometría de flujo.

2.4. Análisis del fenotipo lítico mediante citometría de flujo de los mutantes líticos deficientes en proteasas obtenidos en el cruce genético.

Se eligieron todas las ascosporas líticas que resultaron estar mutadas en alguno de los genes de proteasas, para realizar una medida más exacta de su lisis mediante tinción con yoduro de propidio y análisis mediante citometría de flujo (de la Fuente *et al.*, 1993) con el objeto de establecer la que presentaba una mejor expresión del fenotipo lítico a 37°C con menor lisis a 24°C. Las ascosporas elegidas para realizar este experimento fueron: 1c, 9b, 11c, seleccionadas por ser mutantes *slt2* y tener uno o los dos genes de proteasas mutados, utilizando como cepa control la cepa BJ5464, silvestre para el fenotipo lítico. En el experimento medimos la lisis de los cultivos, tras 15 h de incubación, de las diferentes ascosporas en las siguientes condiciones:

- crecidas en medio YPD a 24°C, temperatura permisiva
- crecidas en medio YPD a 37°C, temperatura no permisiva
- crecidas en medio YPD suplementado con sorbitol 1 M a 37°C.

Los resultados del experimento se muestran en la tabla IX-B y en las figuras 24 (ascosporas 1c y 9b) y 25 (ascospora 11c y cepa BJ5464 como cepa control). En la tabla IX-B se representan los porcentajes de células lisadas, y en las figuras 24 y 25 los diagramas de las citometrías de las diferentes ascosporas, en los que se representa la intensidad de fluorescencia en abscisas, que es una medida de la emisión de fluorescencia por las células que, por estar lisadas, son permeables al yoduro de propidio, y en el eje de las ordenadas se representa el número de células; si el cultivo está lisado, la emisión de fluorescencia es alta y la población celular aparece desplazada a la derecha sobre el eje de las abscisas.

Observando conjuntamente la tabla IX-B y las figuras 24 y 25 (paneles A y D) comprobamos que todas las ascosporas presentaron porcentajes de lisis inferiores al 25% en los cultivos realizados a 24°C, destacando la ascospora 11c con un 5% de lisis (Fig. 25, panel A), porcentaje igual al de la cepa silvestre BJ5464 (Fig. 25, panel D).

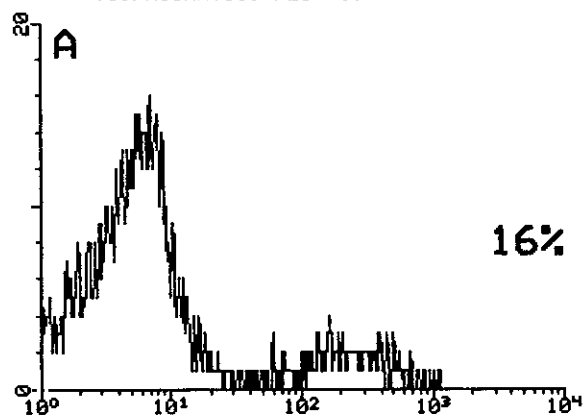
En los cultivos a 37°C, la cepa silvestre no estaba lisada presentando únicamente un 1.5% de lisis (Fig. 25, panel E), frente a las ascosporas 1c con 76% de lisis (Fig. 24, panel B), la 9b con 71% de lisis (Fig. 24, panel E) y la 11c con un 88% de lisis (Fig. 25, panel B), siendo esta ascospora la que presentó un porcentaje superior de células lisadas.

Todos los cultivos realizados a 37°C en presencia de sorbitol 1 M presentaron niveles de lisis inferiores al 25% (Tabla IX-B), destacando la eliminación del fenotipo lítico observada en la ascospora 11c, que ve reducida su lisis en presencia de sorbitol al 1.2% (Fig. 25, panel C), nivel comparable al de la cepa silvestre BJ5464 que es del 1% (Fig. 25, panel F).

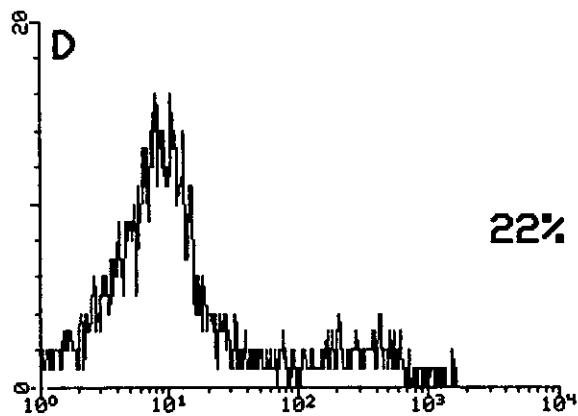
De las observaciones enumeradas anteriormente, se deduce que la ascospora con una mejor expresión del fenotipo lítico fue la 11c, si bien las ascosporas 1c y 9b presentaban también unos buenos niveles de lisis.

Figura 24. Medida de la lisis de las ascosporas *slt2* deficientes en proteasas, mediante citometría de flujo. El medio de cultivo empleado fue YPD. Panel A, ascospora 1c a 24°C; panel B, 1c a 37°C; panel C, 1c a 37°C en medio estabilizado osmóticamente con sorbitol 1 M. Panel D, ascospora 9b a 24°C; panel E, 9b a 37°C; panel F, 9b a 37°C en medio estabilizado osmóticamente con sorbitol 1 M. La lisis se expresa como porcentaje de células ioduro de propidio positivas.

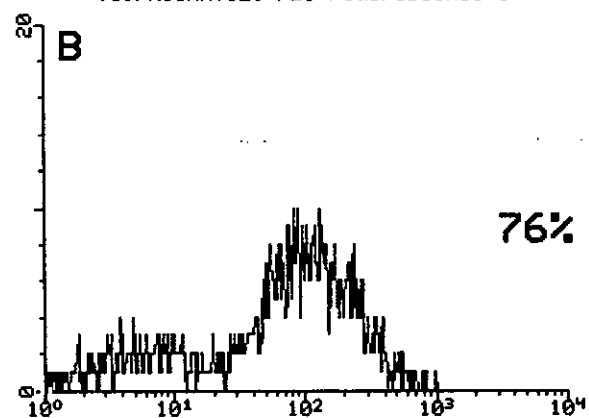
U3:PA05MAY019\FL3\Fluorescence 3



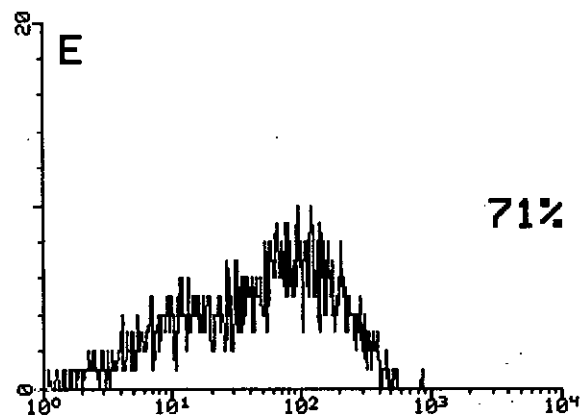
U3:PA05MAY031\FL3\Fluorescence 3



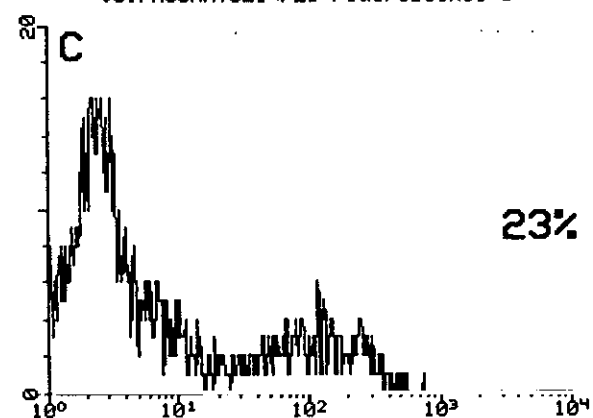
U3:PA05MAY020\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY032\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY021\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY033\FL3\Fluorescence 3

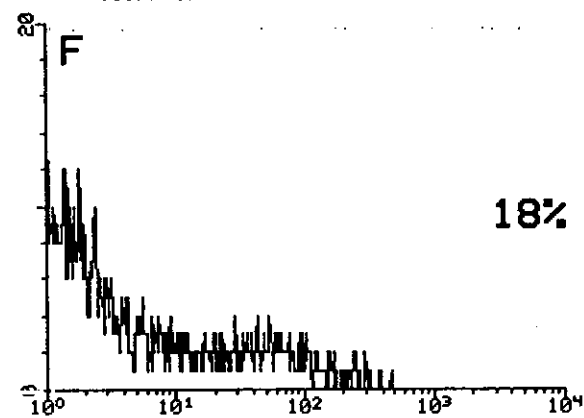
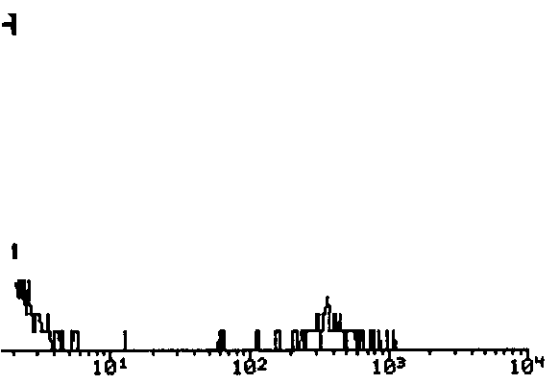
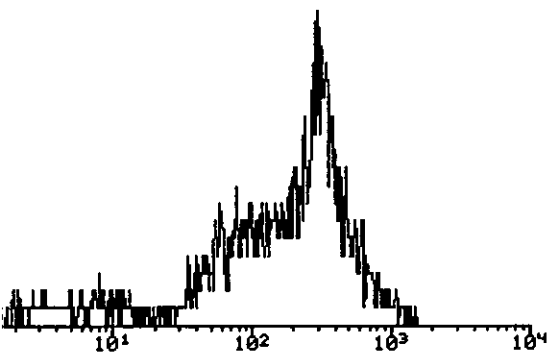


Figura 25. Medida de la lisis de las ascosporas *slt2* deficientes en proteasas y de la cepa parental silvestre BJ5464, mediante citometría de flujo. El medio de cultivo empleado fue YPD. Panel A, ascospora 11c a 24°C; panel B, 11c a 37°C; panel C, 11c a 37°C en medio estabilizado osmóticamente con sorbitol 1 M; panel D, BJ5464 a 24°C; panel E, BJ5464 a 37°C; panel F, BJ5464 a 37°C en medio estabilizado osmóticamente con sorbitol 1 M. La lisis se expresa como porcentaje de células ioduro de propidio positivas.

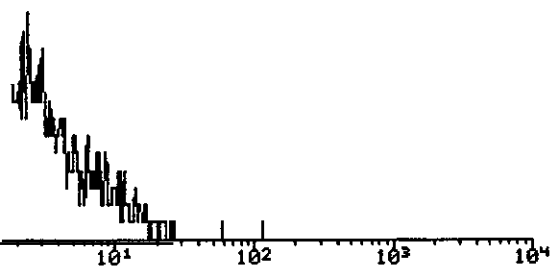
U3:PA05MAY043\FL3\Fluorescence 3



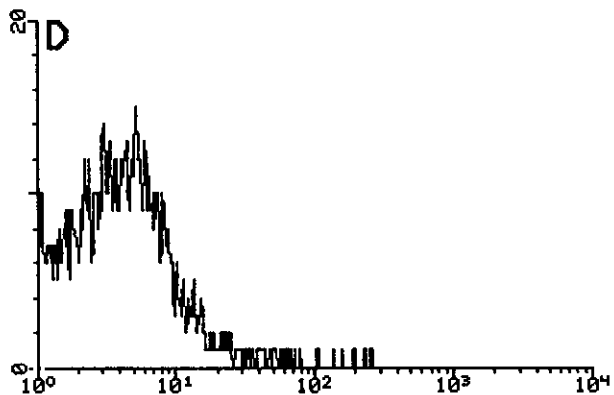
U3:PA05MAY044\FL3\Fluorescence 3



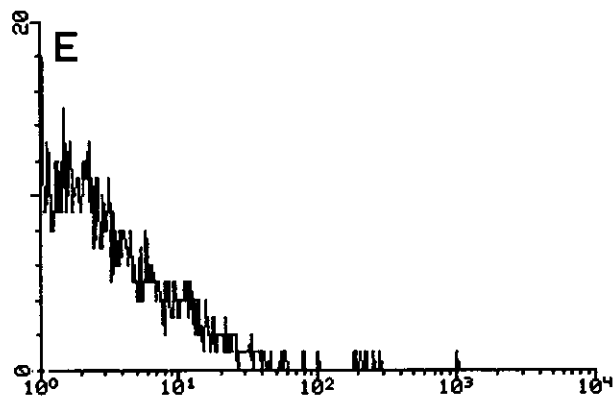
U3:PA05MAY045\FL3\Fluorescence 3



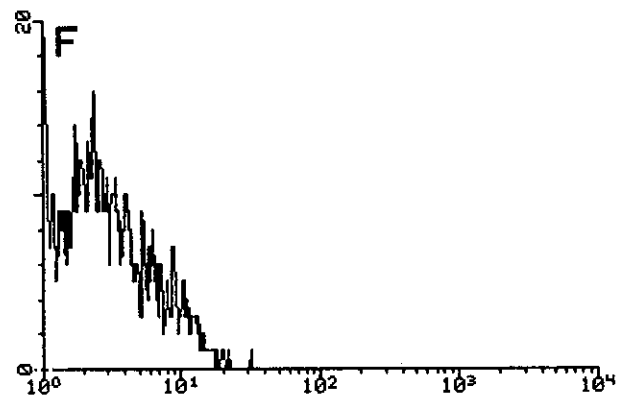
U3:PA05MAY007\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY008\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY009\FL3\Fluorescence 3



Las ascosporas 11c, 1c y 9b fueron designadas, a partir de este momento, como cepas Líticas Haploides Deficientes en Proteasas (LHDP):

- 11c pasa a ser LHDP1
- 1c pasa a ser LHDP2
- 9b pasa a ser LHDP3

Los genotipos completos de las tres nuevas cepas se indican en la tabla IV. La cepa elegida para continuar los experimentos fue la LHDP1 por ser doble mutante, *pep4 prb1*, además de lítica.

2.5. Estudio de la lisis y liberación de proteínas de la cepa LHDP1. Ensayos en matraz.

Como hemos mencionado en el apartado anterior, la cepa elegida para estudiar la liberación y estabilidad de proteínas fue la cepa LHDP1 (ascospora 11c). Los ensayos preliminares se realizaron en matraz, estudiando la liberación de proteínas totales y de fosfatasa alcalina al medio de cultivo, a la temperatura de 37°C, con objeto de proceder a la caracterización de la cepa.

A partir de un preinóculo inicial crecido en medio YPD, a la temperatura de 24°C, procedimos a inocular sendos matraces a 24°C, como control, y a 37°C. Los parámetros medidos fueron la densidad óptica a 600 nm, el nivel de proteínas totales en el medio de cultivo, la lisis medida como porcentaje de células yoduro de propidio negativas y la actividad fosfatasa alcalina en caldos.

En el matraz a 24°C (Fig. 26, panel A) no se observó lisis celular significativa en ningún momento del cultivo, con niveles de viabilidad entre el 85-95% de la población celular, manteniéndose constantes los niveles de proteínas totales en el medio de cultivo, en torno a 15 µg/ml, y permaneciendo la actividad de fosfatasa alcalina en unos niveles basales en torno a 1 UE/ml. En cambio, en el matraz incubado a 37°C (Fig. 26, panel B), observamos una brusca caída de viabilidad del cultivo: 35% a las 3 h, 25% a las 7 h y 10% de viabilidad a las 24 h. Esta brusca caída en la viabilidad del cultivo se correlacionaba con un incremento de 3.5 veces en la cantidad de proteínas totales presentes en el medio de cultivo, así como en un incremento de la actividad fosfatasa alcalina que alcanzó las 27 UE/ml a las 24 h. El perfil observado en la liberación de proteínas totales y de actividad fosfatasa alcalina no sufrió disminución en ningún momento.

En la figura 27 se representan las actividades de fosfatasa alcalina presentes en el extracto celular y en el medio de cultivo a 24°C y 37°C, representadas como UE/DO para poder comparar los datos entre sí. En el cultivo a 24°C, la actividad enzimática permanece mayoritariamente en el extracto celular, no siendo atribuibles las oscilaciones de los extractos celulares a una liberación de la enzima al medio de cultivo, ya que la actividad enzimática en el caldo no aumentó en ningún momento (Fig. 27, panel A). En cambio, en el cultivo a 37°C (Fig. 27, panel B) se observa a lo largo del tiempo que la disminución en la cantidad de actividad enzimática presente en el extracto celular se correlacionó con un incremento progresivo de la actividad enzimática presente en el medio de cultivo, recuperándose a las 24 h en el medio de cultivo el 80% de la actividad

Figura 26. Estudio de la lisis y liberación de proteínas de la cepa LHDP1, en matraz a 24°C (panel A) y a 37°C (panel B). Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (+), viabilidad expresada como porcentaje de células IP(-); (⊕), proteína total en el medio de cultivo (μg/ml); (∇), actividad fosfatasa alcalina en el medio de cultivo (UE/ml).

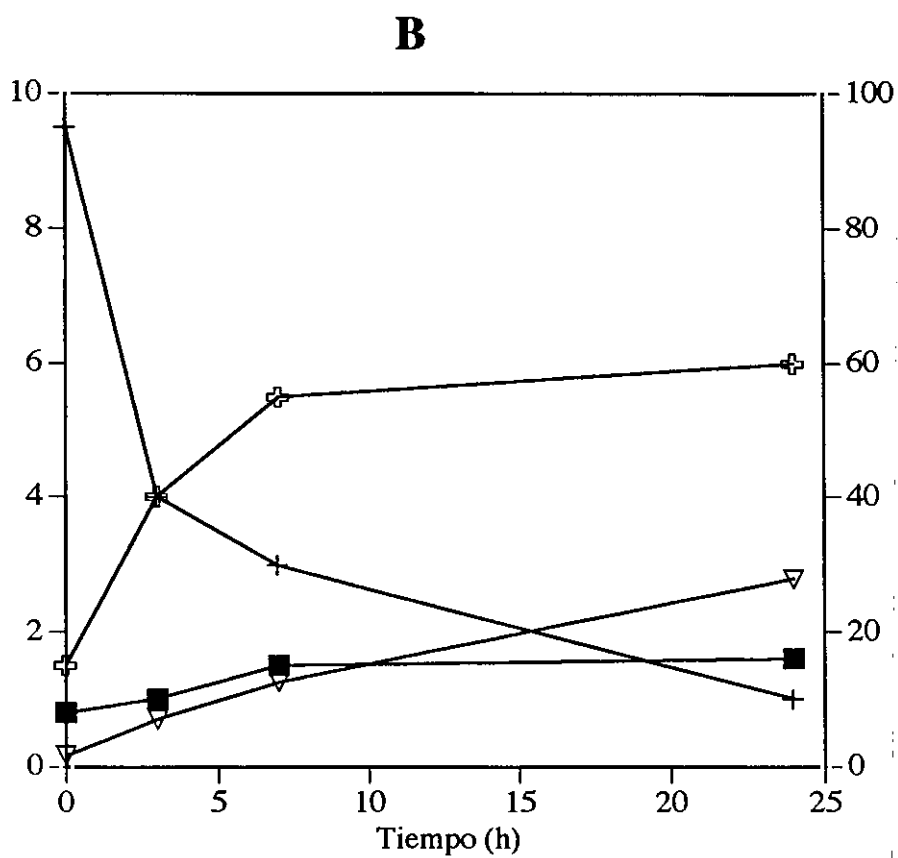
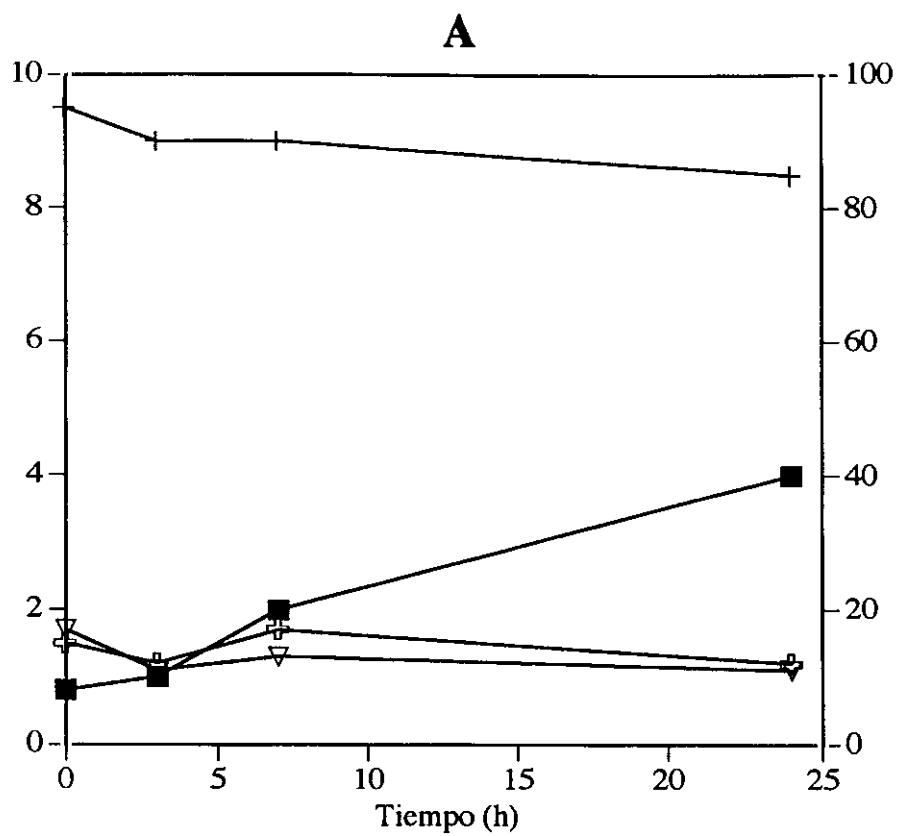
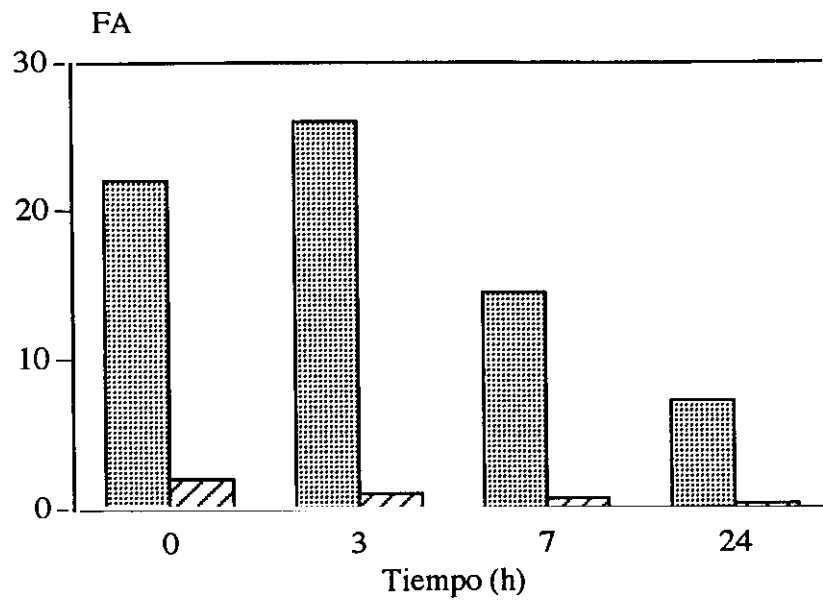
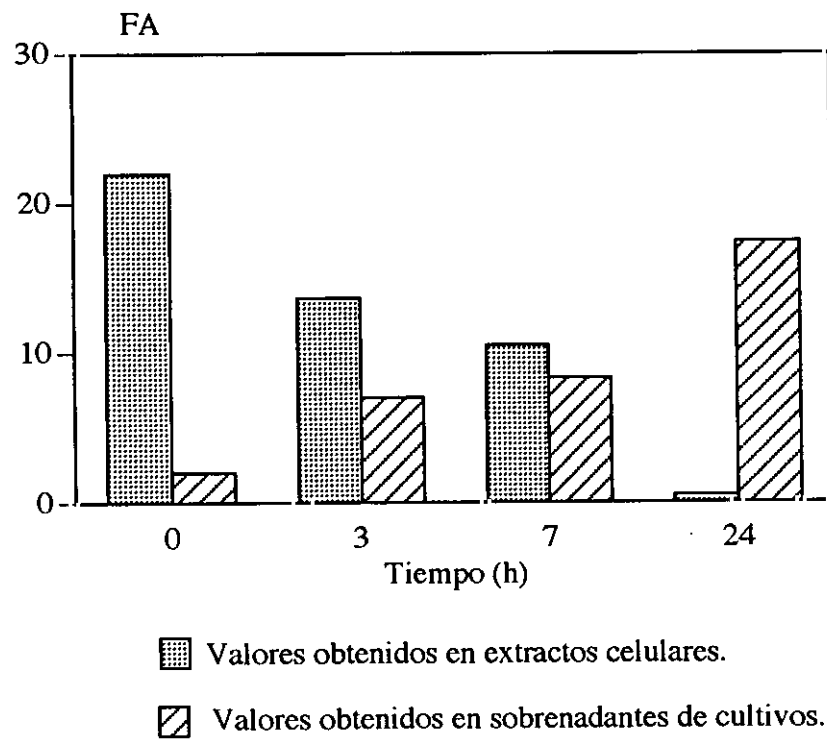


Figura 27. Producción y liberación de fosfatasa alcalina en la cepa LHDP1 en matraz a 24°C (panel A) y a 37°C (panel B). La actividad fosfatasa alcalina se expresa como unidades enzimáticas por densidad óptica de cultivo.

A



B



enzimática, tomando como referencia la cantidad presente en el extracto celular de tiempo cero, correspondiente al momento del cambio de temperatura.

Estos resultados nos indican la capacidad de la cepa LHDP1 para liberar su contenido intracelular como consecuencia de la expresión del fenotipo lítico *slt2*, como ocurría en el caso de la cepa LD1, pero con una mayor estabilidad de los productos liberados a las 24 h del choque térmico.

2.6. Liberación y estabilidad de las proteínas liberadas en cultivos en fermentador de la cepa LHDP1/pCH100L.

A continuación, transformamos la cepa LHDP1 con el plásmido de expresión de CAT, pCH100L, para realizar estudios de liberación y estabilidad de la proteína CAT en escala de fermentador de 10 l en cultivos tipo "batch". Para ello, realizamos dos cultivos en fermentador: uno a 24°C, para observar el comportamiento de la cepa en fermentador y medir la producción de CAT, y otro a 24°C con cambio térmico a 37°C, para estudiar la liberación de CAT al medio de cultivo por dicha cepa.

Al igual que en el caso de la cepa LD1/pCH100L, los cultivos en fermentador los realizamos en medio YPD, creciendo previamente los inóculos en medio mínimo sin leucina con presión selectiva para el mantenimiento del plásmido, con el fin de asegurar el máximo porcentaje de células portadoras de plásmido en el inicio del cultivo. Los resultados del fermentador crecido a 24°C se indican en la figura 28A, siendo concordantes con los obtenidos en matraz, con la cepa sin transformar. La producción de CAT, en el extracto celular, alcanzó las 60 UE/ml, lo que es aproximadamente tres veces superior al nivel detectado en la cepa LD1/pCH100L (Fig. 4A), no detectándose, en ningún momento, actividad CAT en el medio de cultivo. La viabilidad del cultivo, medida por citometría de flujo, se mantuvo durante todo el tiempo en niveles superiores al 80%, no detectándose por tanto en ningún momento un aumento significativo en la cantidad de proteínas totales presente en el medio de cultivo.

Una vez comprobado el comportamiento de la cepa LHDP1 a 24°C, similar al de una cepa silvestre, y la capacidad de producción de CAT en escala de fermentador, procedimos a realizar un fermentador con cambio térmico a 37°C (Fig. 28B). En este caso, tras el cambio de temperatura, se observó una caída brusca de viabilidad que alcanzó el 15% a las 24 h. Este fenómeno se acompañó de un aumento de proteínas totales en el medio de cultivo, y de aparición de actividad CAT y fosfatasa alcalina en el medio de cultivo. Las proteínas totales aumentaron 3.5 veces su cantidad en el caldo pasando de 40 µg/ml a 140 µg/ml, lo que significaba que se estaba produciendo lisis del cultivo con liberación del contenido intracelular al medio de cultivo, que se mantiene con un perfil creciente constante tras el cambio de temperatura. La actividad CAT siguió un perfil similar al de las proteínas totales en el medio de cultivo alcanzando 4.8 UE/ml a las 24 h, no siendo detectable mientras el cultivo era mantenido a 24°C; observaciones similares son válidas para la actividad fosfatasa alcalina valorada como referencia. Estos resultados contrastan con la disminución de estas actividades enzimáticas observadas en el caso de la cepa LD1/pCH100L (Figs. 4B y 5).

Figura 28. Cepa LHDP1/pCH100L crecida, en cultivo discontinuo en fermentador de 10 l, a 24°C; (B) idénticas condiciones con choque térmico a 37°C. Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (+), viabilidad del cultivo, expresada como porcentaje de células IP(-); (⊕), proteínas totales en el medio de cultivo (µg/ml); (▲) actividad CAT en extracto celular (UE/ml); (★), actividad CAT en el medio de cultivo (UE/ml); (▽), actividad fosfatasa alcalina en el medio de cultivo (UE/ml); el cambio térmico de 24°C a 37°C se representa por la línea vertical.

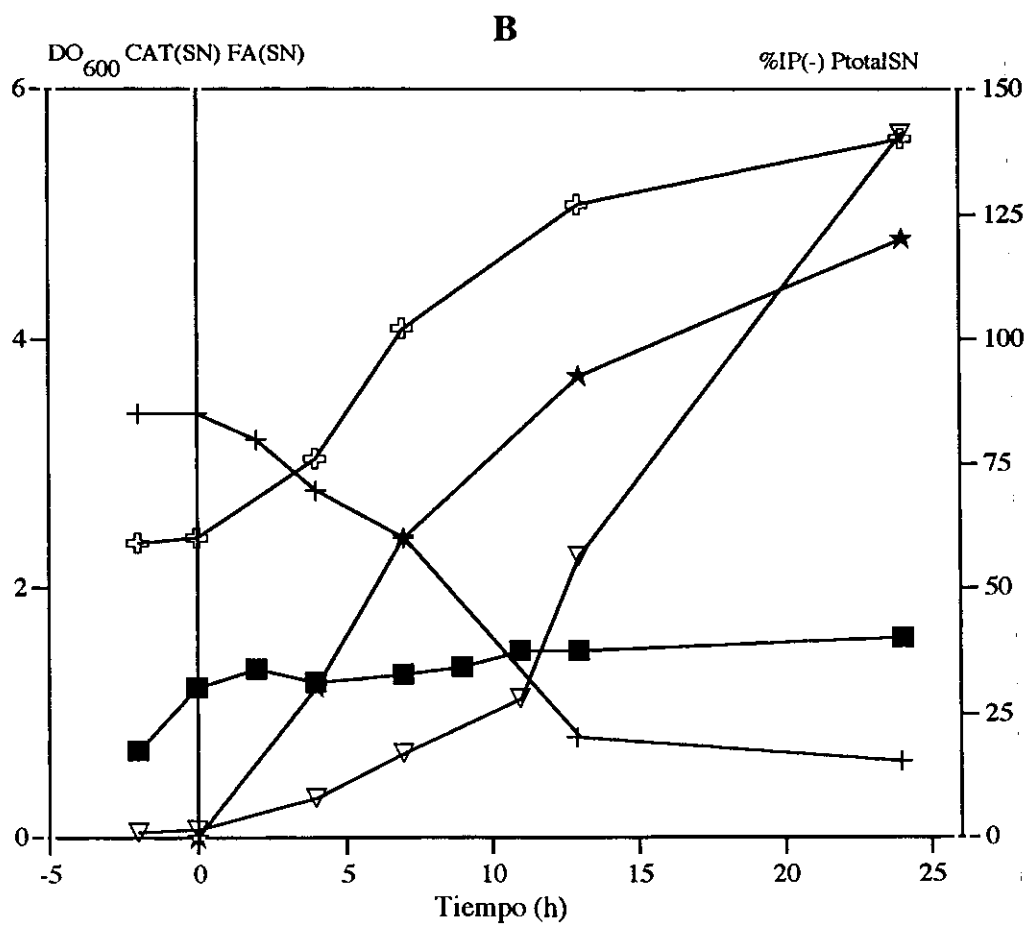
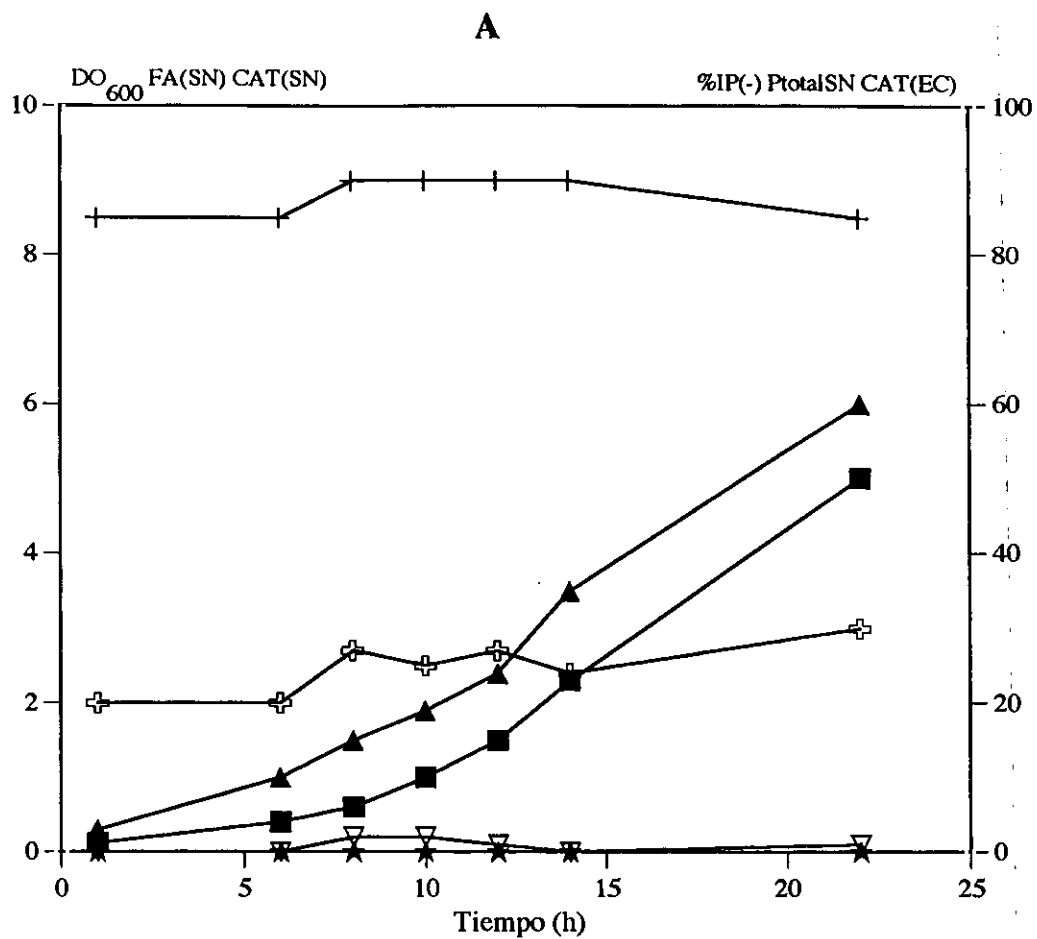
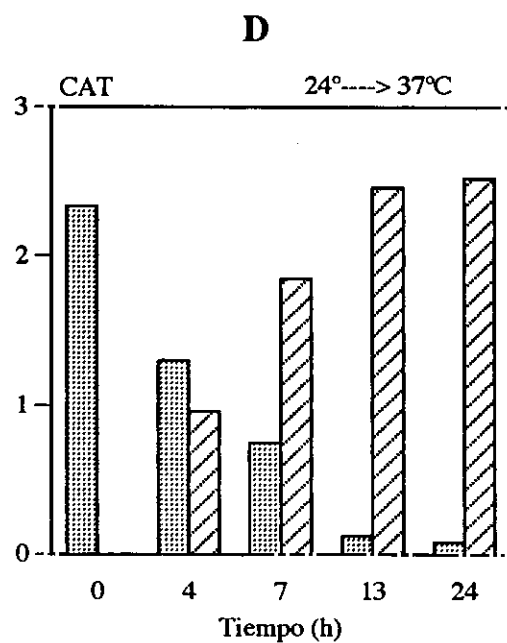
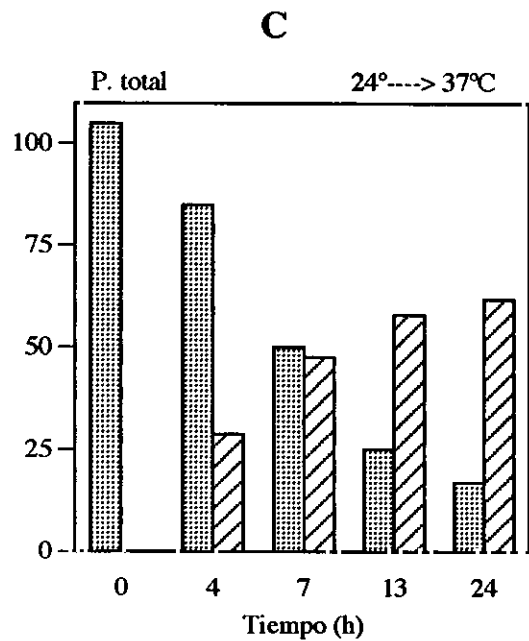
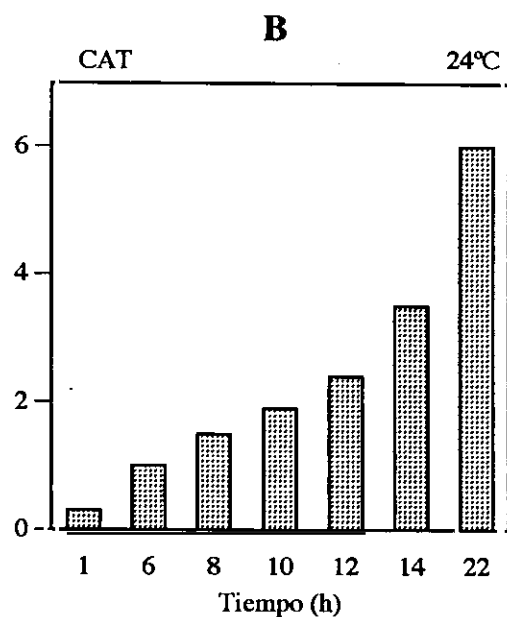
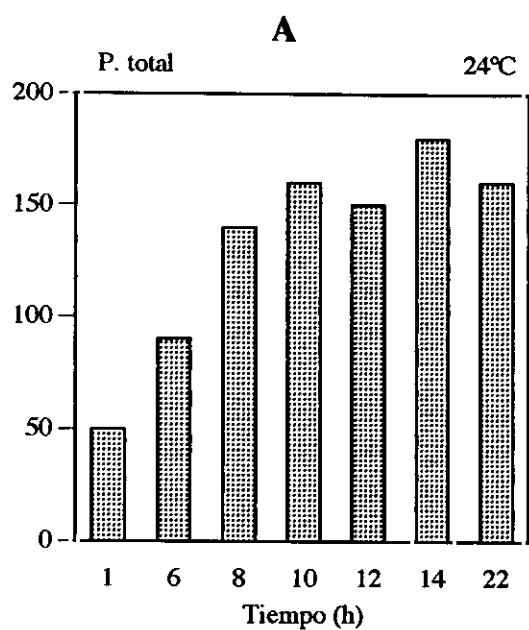




Figura 29. Cepa LHDP1/pCH100L, crecida en cultivo discontinuo en fermentador de 10 l, a 24°C (paneles A y B), y a 24°C con cambio térmico a 37°C (paneles C y D). Se representan los valores de proteínas totales en μg y actividad enzimática CAT en UE, por densidad óptica de cultivo. Las barras punteadas corresponden a medidas efectuadas con extractos celulares y las barras rayadas son medidas realizadas en el medio de cultivo. En los paneles A y B los valores obtenidos en el medio de cultivo no se representan, ya que no fueron significativos.



 Valores obtenidos con extractos celulares.

 Valores obtenidos con sobrenadantes de cultivos.

En la figura 29 se compara la evolución de la cantidad de proteínas totales y actividad CAT, presentes en los extractos celulares y en el medio de cultivo de los fermentadores de la cepa LHDP1/pCH100L correspondientes a 24°C (ver fig. 28A) y con cambio de temperatura a 37°C (ver fig. 28B). En los extractos celulares del fermentador crecido a 24°C, no se observa disminución de la cantidad de proteínas totales presentes en los mismos (Fig. 29, panel A); sin embargo en los correspondientes al fermentador con cambio de temperatura a 37°C, se observó una disminución de la cantidad de proteínas totales al mismo tiempo que iba aumentando la cantidad de proteínas totales presentes en el medio de cultivo (Fig. 29, panel C). La cantidad de proteína presente en el extracto celular correspondiente a las 24 h del cambio de temperatura fue del 16%, mientras que al medio de cultivo se liberó el 70% de la proteína de las células, tomando como referencia la cantidad presente a 24°C (Fig. 29, panel C).

La actividad CAT en el fermentador a 24°C únicamente fue detectable en el extracto celular, siguiendo un perfil creciente a lo largo del cultivo (Fig. 29, panel B); en cambio, en el fermentador con cambio de temperatura se observa una progresiva disminución en la cantidad de actividad CAT presente en el extracto celular, al tiempo que ésta aumenta en el caldo, manteniéndose estable a las 24 h (Fig. 29, panel D).

En ambos casos, es de destacar que se observa una mayor estabilidad de los productos liberados, en comparación con lo observado en la cepa LD1/pCH100L (Fig. 6).

2.7. Perfil electroforético de las proteínas liberadas en un choque térmico de la cepa LHDP1 en fermentador.

Al igual que en el caso de la cepa LD1/pCH100L realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, con el fin de determinar el perfil de proteínas liberadas, como consecuencia de la lisis térmica, al medio de cultivo. Para ello cargamos en el gel muestras iguales de medio de cultivo (20 µl) sin concentrar, correspondientes a 24°C y a varios tiempos después del choque térmico (Fig. 30), volviendo a mostrar un perfil similar al obtenido con la cepa LD1 (Fig. 9), por lo tanto la cepa LHDP1 también muestra capacidad para liberar proteínas en un amplio rango de pesos moleculares, lo que nos permitiría su uso para liberar cualquier proteína heteróloga producida de forma intracelular. En el gel se observa un aumento en la intensidad de las bandas, correlativo con la lisis progresiva que sufre el cultivo a lo largo del tiempo.

2.8. Obtención de mutantes autolíticos deficientes en proteasas por interrupción del gen *SLT2* en la cepa BJ5464.

La segunda estrategia consistió en interrumpir el gen *SLT2* en una cepa con un fondo genético deficiente en proteasas, como la cepa de colección BJ5464, doble mutante *pep4 prb1*.

La transformación se realizó con el fragmento lineal EcoRI del plásmido pIC20 *slt2ΔURA3*, donde el fragmento HindIII del gen *SLT2* había sido reemplazado por el gen *URA3*, para aumentar la eficiencia de la recombinación homóloga de la copia del gen interrumpida con el gen silvestre presente en el genoma de la levadura (Fig. 31).

Figura 30. Perfil electroforético de las proteínas presentes en el sobrenadante de medio de cultivo a 24°C y a 37°C en la cepa LHDP1. En todas las calles se han utilizado muestras de 20 µl de sobrenadante de medio de cultivo. Calle 1, patrón de pesos moleculares; calles 2 y 3, sobrenadantes de medio de cultivo a 24°C; calle 4, sobrenadante de medio de cultivo tras 3 horas a 37°C; calle 5, tras 6 horas a 37°C; calle 6, tras 9 horas a 37°C; calle 7, tras 12 horas a 37°C; calle 8, tras 24 horas a 37°C.

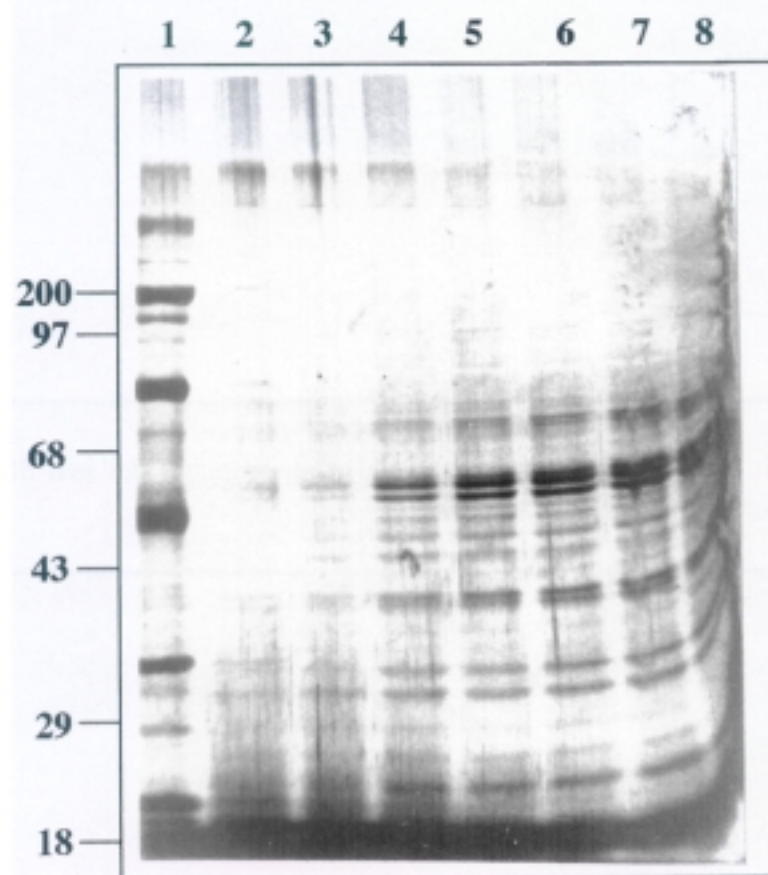
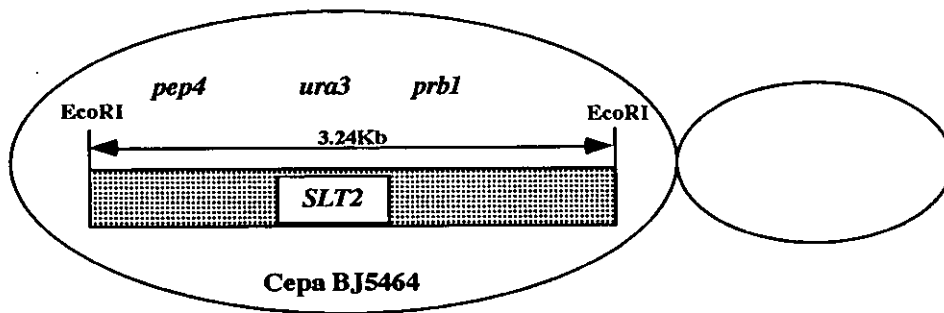
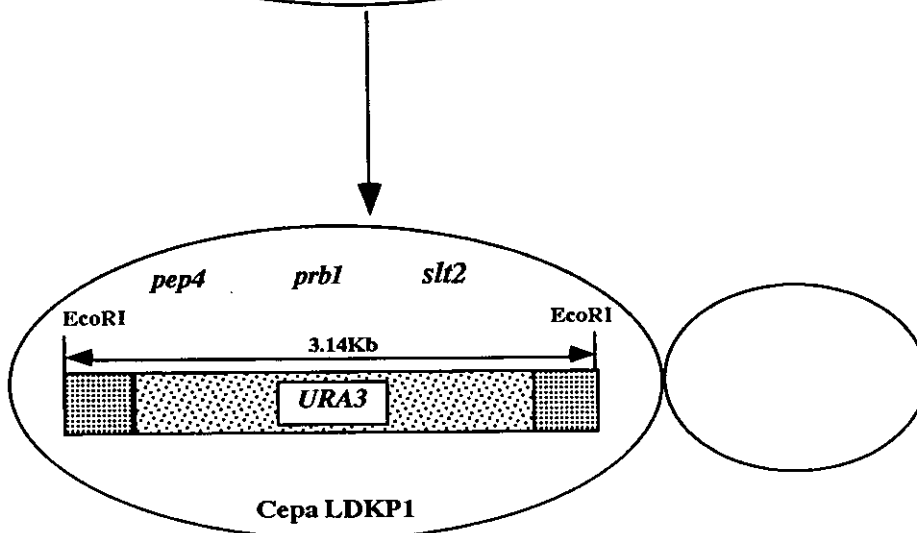
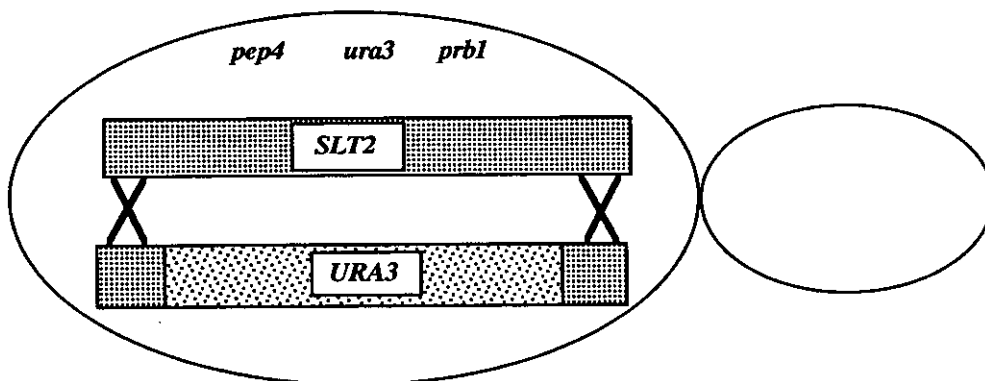
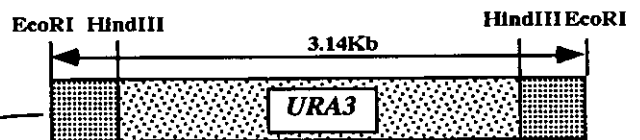


Figura 31. Detalles de la realización de la interrupción del gen *SLT2* en la cepa BJ5464 para obtener la cepa LDKP1.



Transformación de la levadura con el fragmento lineal *EcoRI* del plásmido pIC20 *slt2 ΔURA3*



Se analizaron un total de 15 transformantes Ura⁺ por análisis fenotípico en placa de forma similar al descrito en el apartado 2.2, seleccionándose cinco de ellos que presentaban las características fenotípicas esperadas:

-lisis a la temperatura de 37°C, apareciendo las colonias color azul-verdoso en placas con BCIP, frente a la parental que aparece sin coloración, la presencia de sorbitol en el medio restauraba la capacidad de crecimiento y la lisis, apareciendo de igual coloración que la cepa parental (Fig. 32, paneles A y B).

-lisis por sensibilidad a cafeína 12 mM a 24°C, evitada por la presencia de sorbitol en la placa (Fig. 32, paneles C y D).

Con los cinco transformantes seleccionados se realizó la confirmación definitiva de que estaban interrumpidos en el gen *SLT2*, por medio de una hibridación DNA-DNA ("Southern"), demostrando los cinco transformantes estar interrumpidos en dicho gen, el DNA genómico de *S. cerevisiae* se digirió con la endonucleasa de restricción EcoRI, el tamaño esperado para el fragmento portador del gen silvestre era de 3.24 Kb, mientras que el del fragmento con el gen interrumpido era inferior, 3.14 Kb (Fig. 32, panel E), los cinco transformantes aparecen con una banda de inferior tamaño a la del gen silvestre confirmando la interrupción del gen *SLT2* en dichos transformantes. La sonda empleada fue el fragmento EcoRI del gen *SLT2* (Torres *et al.*, 1991). La cepa BJ5464 *slt2ΔURA3* pasa a denominarse LDKP1 (Lítica Deficiente en Quinasa y Proteasas 1).

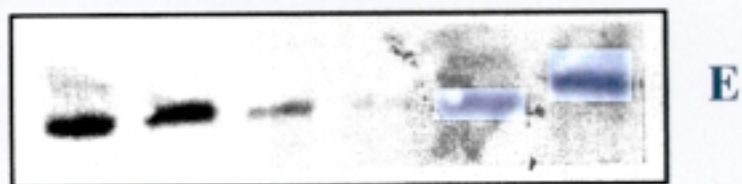
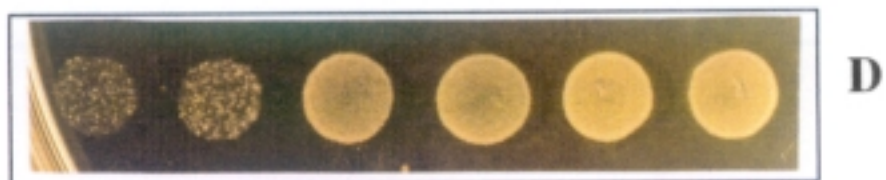
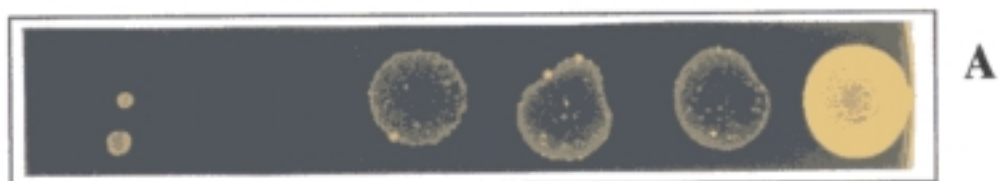
2.9. Medida de la lisis en la cepa LDKP1 por citometría de flujo.

A continuación estudiamos la expresión del fenotipo lítico de esta cepa, midiendo la lisis que presentaba la nueva cepa mediante citometría de flujo, en cultivos crecidos 15 h en las siguientes condiciones:

- crecida en medio YPD a 24°C, temperatura permisiva
- crecida en medio YPD a 37°C, temperatura no permisiva
- crecida en medio YPD suplementado con sorbitol 1 M a 37°C.

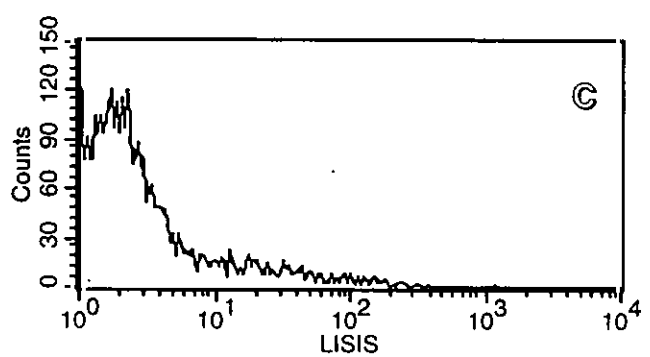
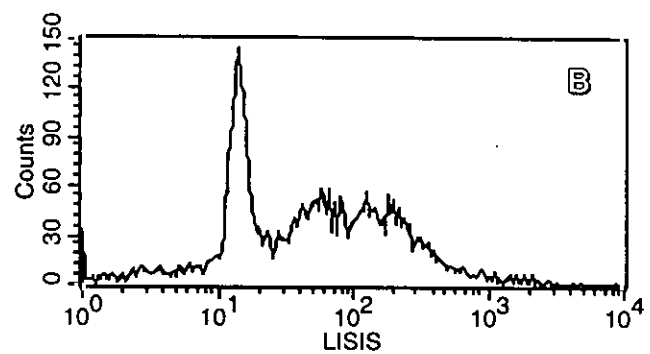
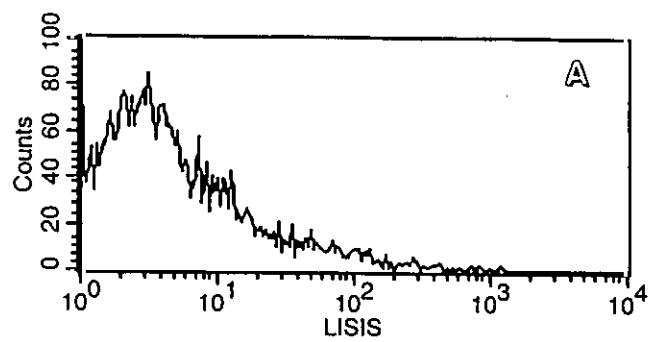
Los diagramas de las citometrías se muestran en la figura 33. En el panel A aparecen las células crecidas a 24°C, la mayoría de la población celular era viable con sólo un 8% de células lisadas, frente al 80% de células lisadas cuando el crecimiento se realizaba a 37°C (panel B). La presencia de un estabilizador osmótico, sorbitol 1 M, a 37°C disminuyó la lisis de las células hasta un 6% (panel C). Estos resultados indicaban la correcta expresión del fenotipo lítico debido a la presencia de la mutación *slt2* en la nueva cepa.

Figura 32. Análisis de cinco transformantes de la cepa BJ5464 con la construcción pIC20*slt2ΔURA3*. Panel A, crecimiento en YPD BCIP a 37°C; panel B, crecimiento en YPD BCIP 1 M sorbitol a 37°C; panel C, crecimiento en YPD 12 mM cafeína a 24°C; panel D, crecimiento en YPD 12 mM cafeína con 1 M sorbitol a 24°C; panel E, resultado de la hibridación DNA-DNA con la sonda del gen *SLT2*.



T1	T2	T3	T4	T5	BJ5464
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	---------------

Figura 33. Medida de la lisis de la cepa LDKP1, mediante citometría de flujo. El medio de cultivo empleado fue YPD. Panel A, 24°C; panel B, 37°C; panel C, 37°C, en medio estabilizado osmóticamente con sorbitol 1 M.



3. LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN MUTANTES AUTOLÍTICOS DE *S. cerevisiae* POR CHOQUE OSMÓTICO.

Los resultados anteriores, descritos para las cepas LD1 y LHDP1, demostraban la capacidad para liberar proteínas heterólogas intracelulares, cuando las células eran lisadas por medio de un choque térmico. Nos planteamos el desarrollo de sistemas alternativos para producir la lisis de una forma controlada. Aprovechando la complementación por estabilización osmótica de la lisis, estudiamos qué sucedía cuando células crecidas en presencia de un estabilizador osmótico a 37°C eran resuspendidas en un medio sin estabilización osmótica; es lo que denominaremos de ahora en adelante un choque osmótico.

3.1. Ensayos preliminares de choque osmótico en la cepa LHDP1.

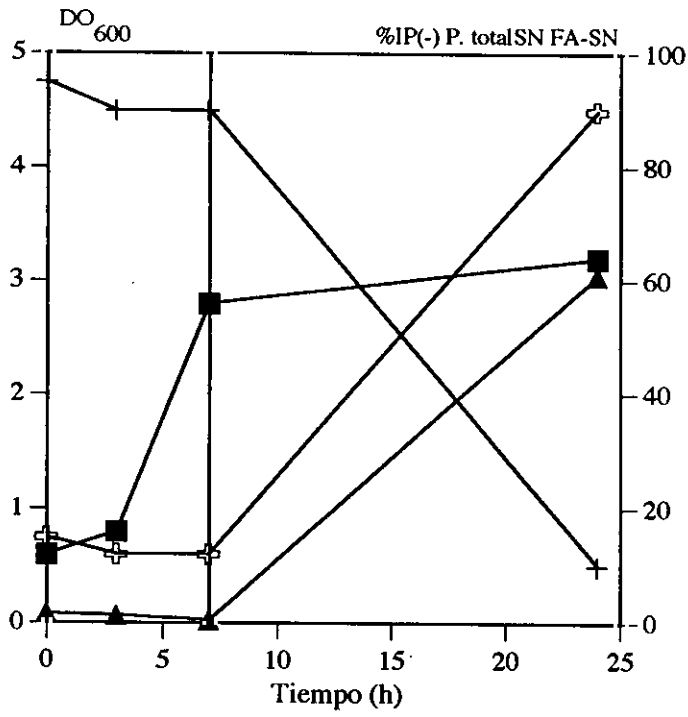
Los ensayos se realizaron en cultivos de la cepa LHDP1, crecidos en YPD con sorbitol 1 M a 37°C hasta DO 3, se centrifugaron las células, midiéndose los niveles de proteínas totales y de fosfatasa alcalina en ese momento, valores de referencia, y se resuspenden a continuación en YPD, tras una incubación a 37°C durante toda la noche, se midieron las cantidades de proteínas totales y de actividad fosfatasa alcalina a las 16 h (Fig. 34, panel A). Se observa una caída de viabilidad del 90%, un incremento de 5 veces en la cantidad de proteínas totales presentes en el medio de cultivo, la actividad fosfatasa alcalina pasa de ser indetectable a 60 UE/ml, lo que nos indicaba que era posible lograr lisis eficiente del cultivo por este método. En el diagrama de barras (Fig. 34, panel B) observamos como mientras el cultivo era mantenido en presencia de sorbitol, la actividad fosfatasa alcalina permanecía mayoritariamente en el interior de las células y tras la eliminación del estabilizador osmótico, la actividad enzimática pasaba a ser mayoritariamente detectada en el caldo. Así pues, el choque osmótico parecía ser un método adecuado para lograr la liberación del contenido intracelular, debido a la lisis que produce en las células.

3.2. Medida de la lisis en un choque osmótico por citometría de flujo.

Con el fin de establecer cuánto tiempo tardaban las células en lisarse, cuando eran sometidas a un choque osmótico, decidimos realizar un seguimiento de la lisis mediante citometría de flujo. Para ello células crecidas a 37°C en medio estabilizado osmóticamente hasta fase exponencial, se recogían las células por centrifugación resuspendiéndolas en agua midiéndose la lisis antes e inmediatamente después del choque osmótico. Las cepas elegidas para realizar el experimento fueron: LD1, LHDP1, LHDP2, LHDP3 y LDKP1. Los estabilizadores osmóticos ensayados fueron NaCl al 1.5% y sorbitol en concentraciones 1 M, 0.5 M, 0.25 M, todos ellos en cultivos crecidos a 37°C; como control utilizamos cultivos de las mismas cepas crecidos en sorbitol 1 M a la temperatura de 24°C. En la tabla X se muestran los diferentes porcentajes de lisis alcanzados en las diferentes condiciones de cultivo. Las cepas LD1, LHDP1 y LDKP1 presentaron una buena eliminación del fenotipo lítico en presencia de sorbitol 1 M, 0.5 M y NaCl 1.5%, con una lisis inferior al 10%, siendo mayores los porcentajes de lisis en presencia de sorbitol 0.25 M. La lisis alcanzada por choque osmótico en las células de estas cepas fue superior al 70% en todos los casos excepto en la cepa LHDP1 crecida en NaCl 1.5%. Las cepas LHDP2 y LHDP3 sólo presentaron bajos niveles de lisis cuando crecían en presencia de sorbitol 1 M, alcanzando lisis

Figura 34. Liberación de proteínas, tras un choque osmótico, en la cepa LHDP1. Panel A, crecimiento inicial de la cepa en medio estabilizado osmóticamente a 37°C, la línea vertical representa el cambio a un medio no estabilizado osmóticamente. Leyenda: (■), densidad óptica a 600 nm; (+), viabilidad celular, expresada como porcentaje de células IP(-); (⊕), proteínas totales en el medio de cultivo (μg/ml); (∇), actividad fosfatasa alcalina en el medio de cultivo (UE/ml). Panel B, actividad de fosfatasa alcalina en el interior de las células (barras punteadas) y en el medio de cultivo (barras rayadas). Las medidas a las 0, 3 y 7 horas corresponden a medio de cultivo estabilizado osmóticamente, la de 24 horas corresponde a medio de cultivo sin estabilización osmótica. La actividad fosfatasa alcalina se expresó como UE por densidad óptica del cultivo.

A



B

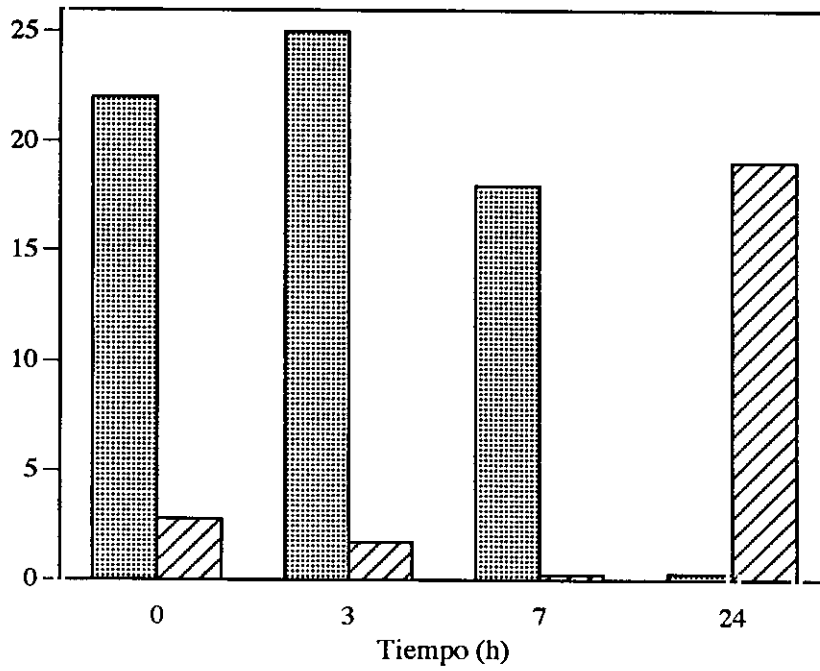


Tabla X. Resultado de la lisis de choques osmóticos, en diferentes estabilizadores osmóticos, de las cepas LD1, LHDP1, LHDP2, LHDP3 y LDKP1.

CEPA	YPD 37°C Sorbitol 1M		YPD 37°C Sorbitol 0.5 M		YPD 37°C Sorbitol 0.25M		YPD 37°C 1.5% NaCl		YPD 24°C Sorbitol 1M	
	+§	-§	+	-	+	-	+	-	+	-
LD1	2	80	2	76	6	65	9	65	2	4
LHDP1	2	81	3	67	30	77	2	40	5	4
LHDP2	23	96	49	97	55	97	65	91	5	7
LHDP3	18	97	52	97	42	97	43	93	3	3
LDKP1	6	72	4	23	20	48	5	20	2	7

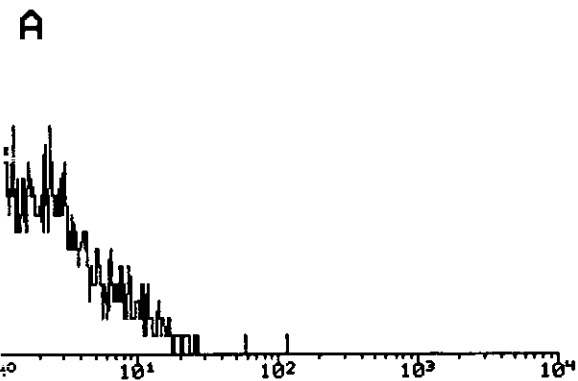
Lisis celular expresada como porcentaje de células teñidas con yoduro de propidio, medida por citometría de flujo.

+§: lisis medida en presencia del estabilizador osmótico.

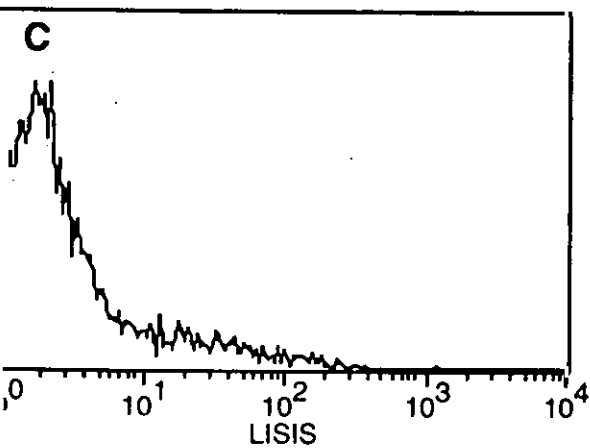
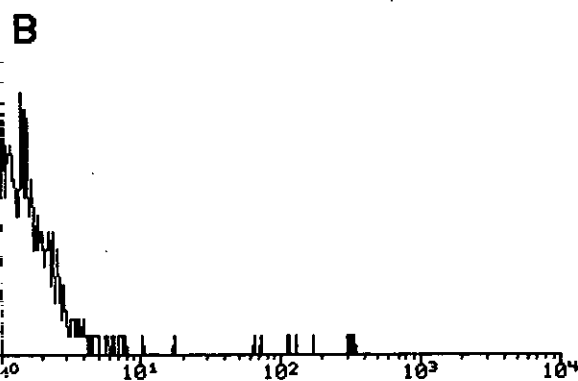
-§: lisis medida en agua, choque osmótico.

Figura 35. Medida de la lisis de las cepas LD1, LHDP1 y LDKP1 sometidas a choque osmótico, mediante citometría de flujo. Se representa la lisis de las células en medio estabilizado osmóticamente (LD1 (A), LHDP1 (B), LDKP1 (C)) y tras la resuspensión de las mismas en agua (LD1 (D), LHDP1 (E), LDKP1 (F)). La lisis celular se expresa como porcentaje de células yoduro de propidio positivas.

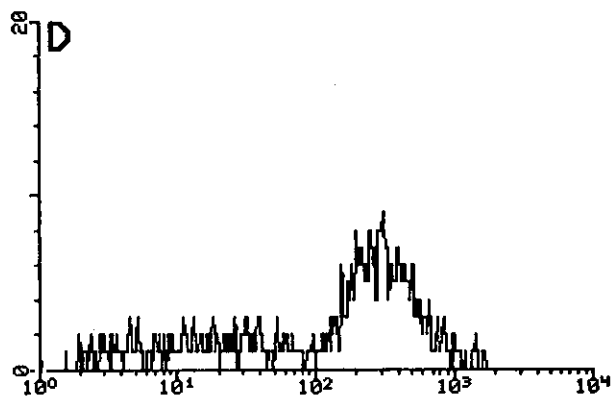
U3:PA05MAY045\FL3\Fluorescence 3



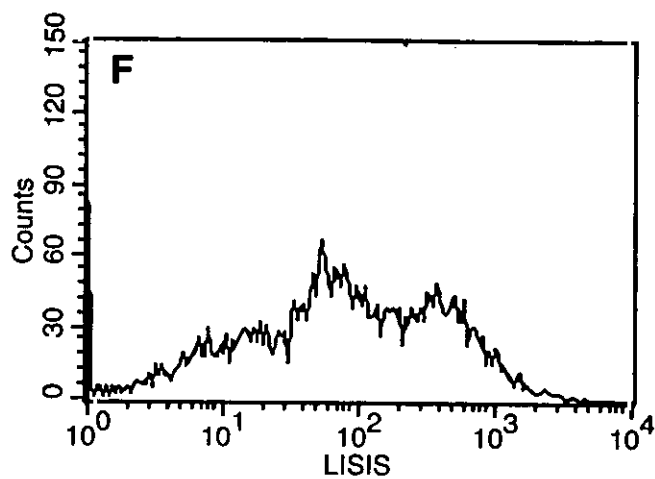
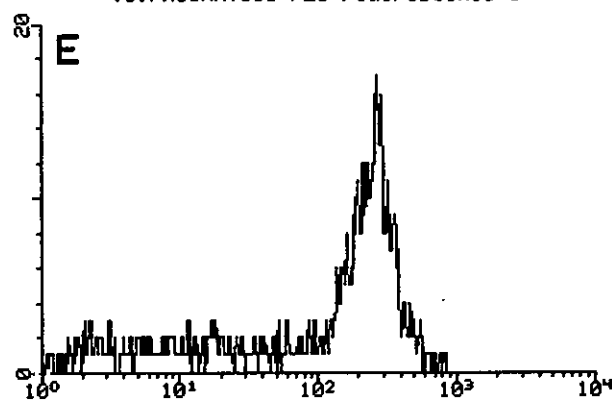
U3:PA05MAY015\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY093\FL3\Fluorescence 3



U3:PA05MAY063\FL3\Fluorescence 3



superiores al 90% cuando son sometidas a un choque osmótico. En la figura 35, se muestran las gráficas, obtenidas por citometría de flujo, de las cepas LD1, LHDP1 y LDKP1, en presencia y ausencia de estabilización osmótica, observándose como la mayoría de la población celular se lisaba tras la retirada del estabilizador osmótico. En cultivos de mutantes *slt2* crecidos a 37°C en presencia de concentraciones 1 y 0.5 M de sorbitol, tras la eliminación del estabilizador osmótico, es posible lograr niveles de lisis superiores al 80% de forma inmediata. La lisis producida por el choque osmótico parecía ser dependiente de la temperatura a la que crecían las células, ya que los cultivos de estas cepas, crecidos en presencia de sorbitol 1 M, a 24°C no sufrían lisis celular cuando eran transferidos a agua (Tabla X).

3.3. Perfil electroforético de las proteínas liberadas al medio de cultivo por choque osmótico.

A continuación se procedió a comprobar el perfil de proteínas liberadas al medio de cultivo con este método de lisis; para verificar si era comparable al obtenido por choque térmico. Para ello, realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (Fig. 36), cargando muestras iguales de caldos de cultivo, antes y después del choque osmótico, de las cepas DBY-746 (*SLT2*), LD1, LHDP1 y LHDP2. Sólo se observó la presencia de proteínas, tras el choque osmótico, en las muestras correspondientes a las cepas líticas, calles 6, 8, 10; que mostraban un perfil similar al de un extracto celular, calle 2, y al obtenido por la lisis tras un choque térmico (Figs. 9 y 32).

3.4. Liberación de CAT por choque osmótico en cepas líticas de *S. cerevisiae*.

Una vez establecido que la lisis era inmediata, tras la eliminación del estabilizador osmótico, y que había liberación de proteínas al medio de cultivo, procedimos a estudiar la liberación de CAT, como proteína heteróloga producida por cepas *slt2*. El experimento se realizó creciendo las células en medio YPD con sorbitol 1 M a la temperatura de 37°C, hasta mitad de fase exponencial, equivalente a densidad óptica 1.5 a 3, recogiendo las células por centrifugación y resuspendiéndolas en igual volumen de solución tampón, tipo TE, durante 15 minutos, procediéndose a evaluar la liberación de las proteínas en las muestras de sobrenadante de cultivos (SN) (Fig. 37). Previamente antes de eliminar el estabilizador osmótico, se tomó una muestra del cultivo que sirviera como valor de referencia. Los parámetros evaluados en el extracto celular y sobrenadante de medio de cultivo y de solución tampón, antes y después del choque osmótico, respectivamente fueron:

- proteínas totales
- actividad CAT.

Las cepas empleadas en el experimento fueron LD1, LHDP1 y LDKP1, todas ellas transformadas con el plásmido de expresión de CAT, pCH100L. Los resultados del experimento se expresan como mg de proteínas totales/DO y UE de CAT/DO, tanto en extractos celulares como en caldo de medio de cultivo (antes del choque osmótico) y sobrenadante de la solución tampón (después del choque osmótico). Los diagramas de barras de la figura 38 muestran que tras el choque osmótico, se producía una disminución en las proteínas totales presentes en el interior de las células disminuyendo los valores de proteínas totales presentes en los extractos celulares

Figura 36. Perfil electroforético de las proteínas presentes en el sobrenadante de un medio de cultivo, antes y después de un choque osmótico, en las cepas DBY-746 (*SLT2*), LD1, LHDP1 y LHDP2. En todas las calles se han utilizado muestras de 20 μ l de sobrenadante de medio de cultivo. Calle 1, patrón de pesos moleculares; calle 2, muestra de un extracto celular de la cepa DBY-746; calles 3 y 4, sobrenadantes de medio de cultivo de DBY-746 antes y después del choque osmótico, calles 5 y 6, sobrenadantes de medio de cultivo de LD1 antes y después del choque osmótico; calles 7 y 8, sobrenadantes de medio de cultivo de LHDP2 antes y después del choque osmótico; calles 9 y 10, sobrenadantes de medio de cultivo de LHDP1 antes y después del choque osmótico.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

200

97

68

43

29

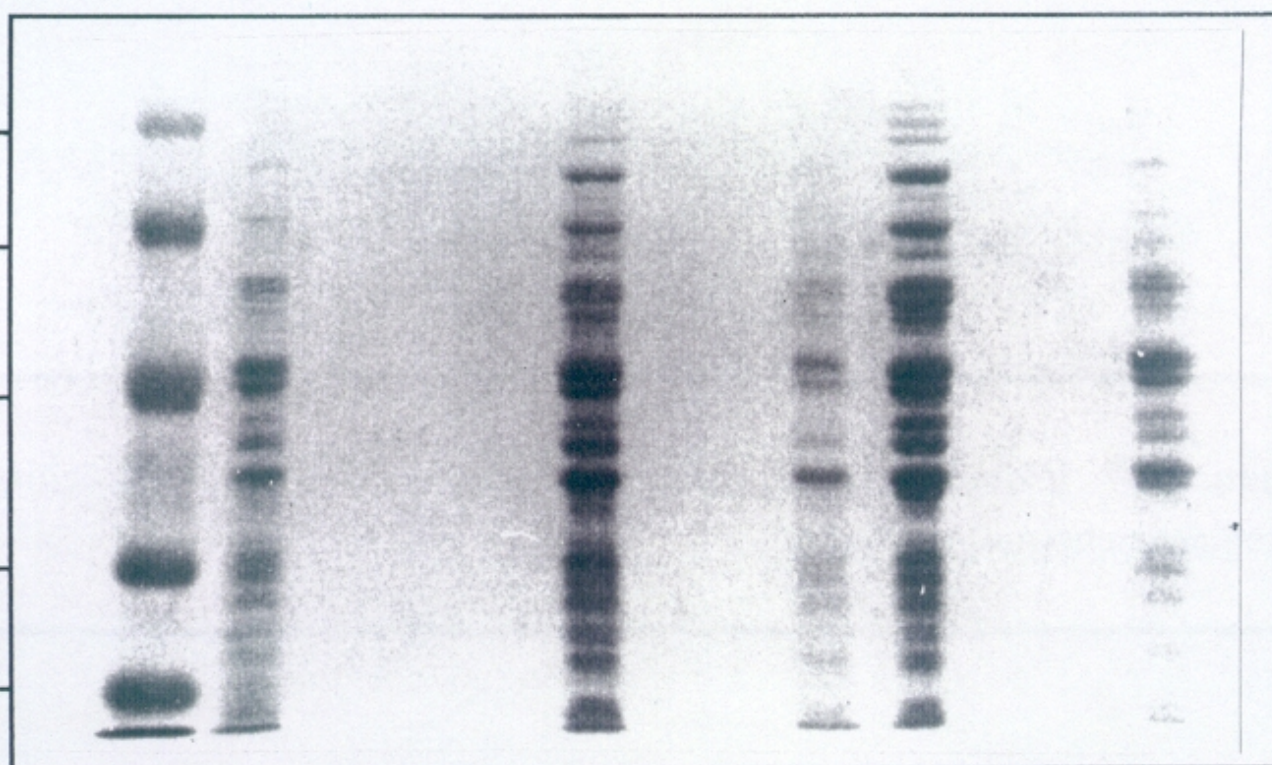
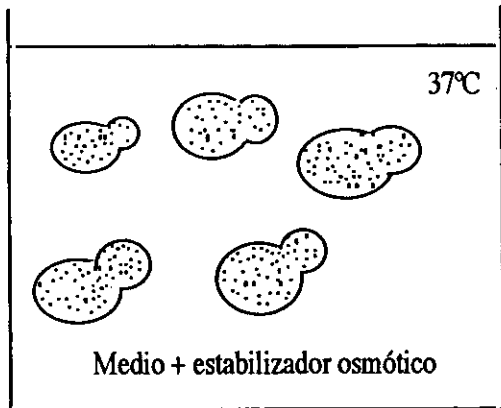
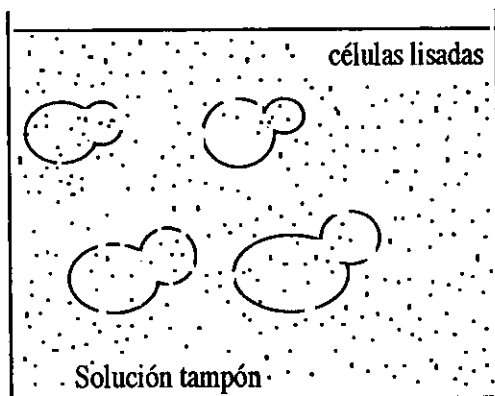


Figura 37. Esquema del proceso para la obtención de preparaciones de proteínas mediante choque osmótico.



Centrifugación
3000g 5'

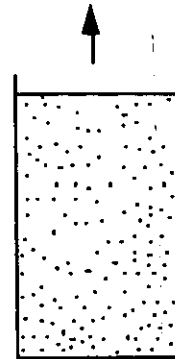


Célula de levadura



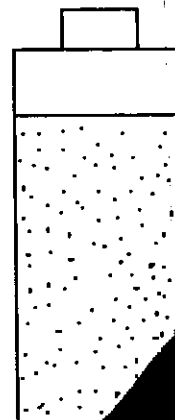
Proteína heteróloga

Medida de actividades
enzimáticas y/o purificación



Preparación cruda de proteínas

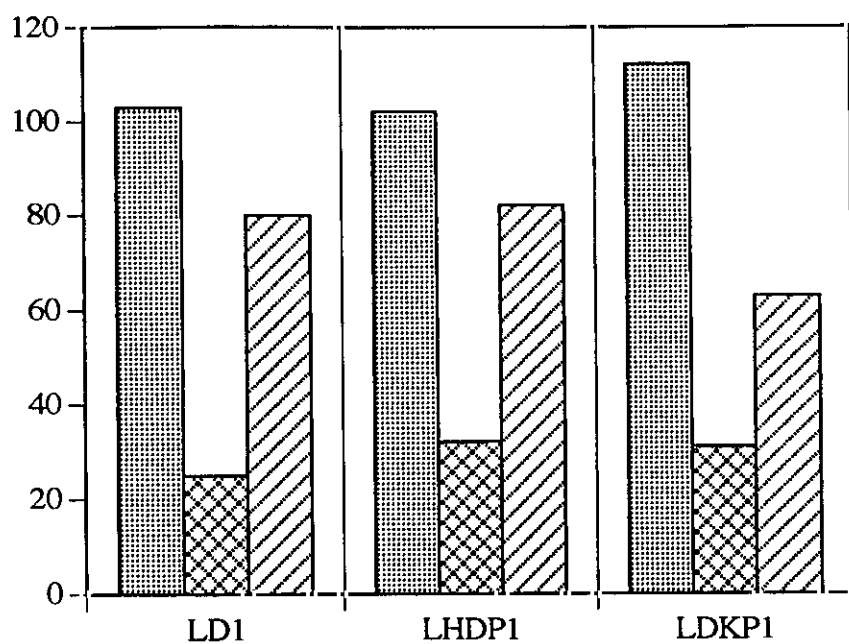
Centrifugación
10000g 15'



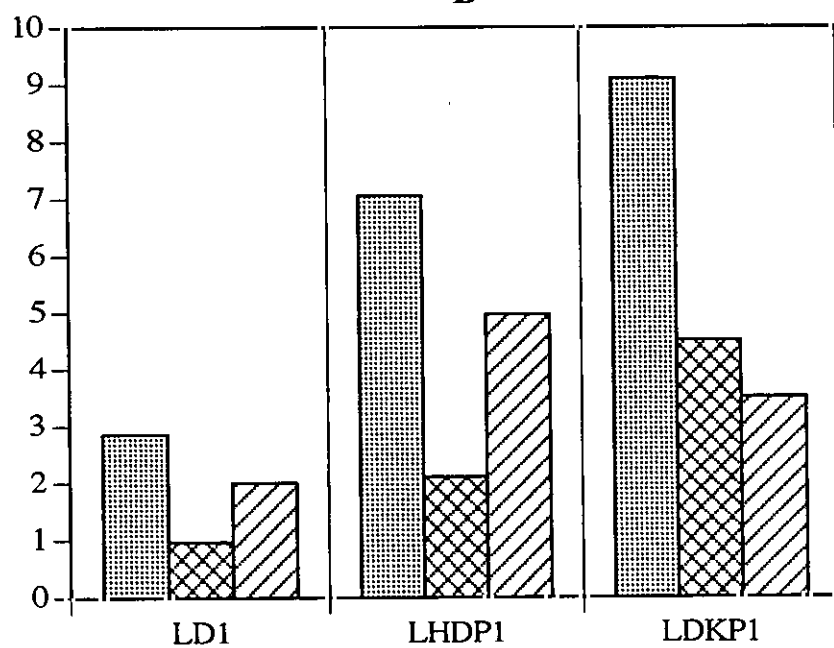
Centrifugación
3000g 5'




Figura 38. Liberación de la proteína heteróloga CAT, tras choque osmótico, de las cepas LD1, LHDP1 y LDKP1, transformadas con el plásmido pCH100L. Panel A, medida del contenido en proteínas totales ($\mu\text{g}/\text{DO}$), de los extractos celulares, antes y después del choque osmótico, y en el sobrenadante del medio de cultivo después del choque osmótico; panel B, medida de la actividad CAT (UE/DO), en idénticas condiciones que en el panel A.

A



B



-  Extracto celular antes choque osmótico
-  Extracto celular después del choque osmótico
-  Sobrenadante después del choque osmótico

(Fig. 38, panel A), al igual que la actividad CAT, que era liberada al caldo como consecuencia de la lisis que sufren las células (Fig. 38, panel B). Volvimos a observar una mayor producción de CAT en la cepa LHDP1, en comparación con la cepa LD1. La cantidad relativa de CAT liberada en las tres cepas líticas fue similar, en torno al 60-70% de la actividad inicial presente en el interior de las células (Fig. 38, panel B).

3.4.1. Estudio de la influencia del tiempo en la liberación de proteínas por choque osmótico.

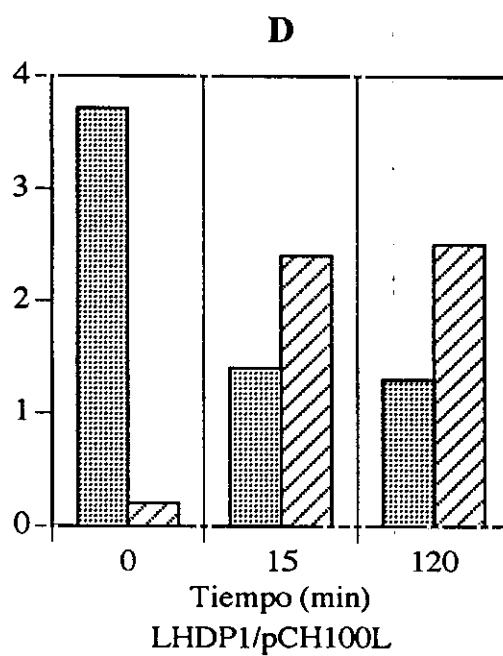
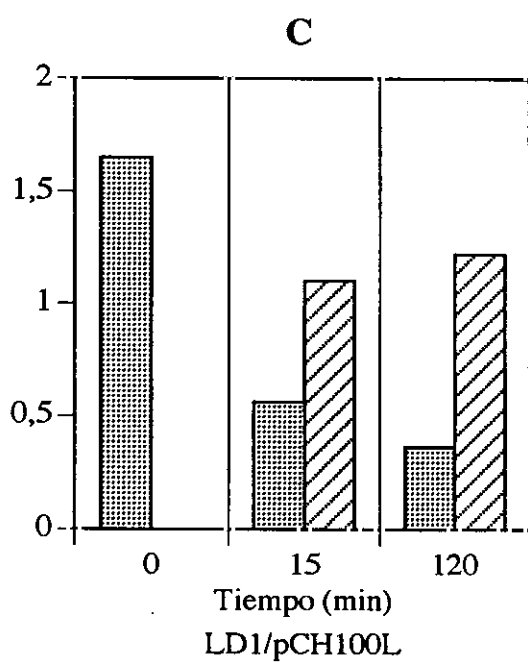
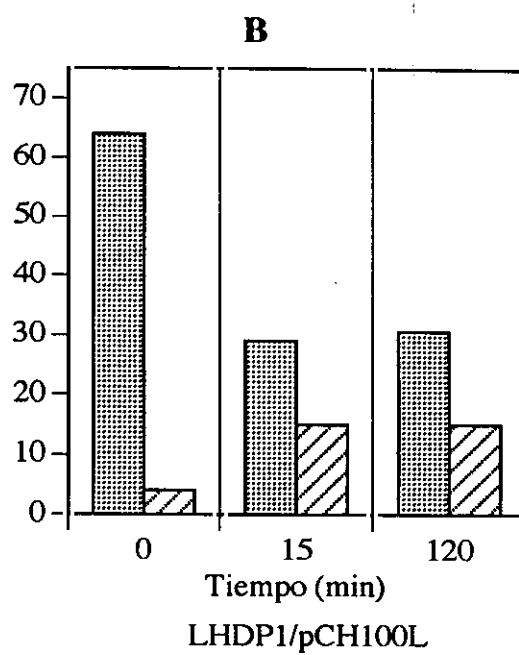
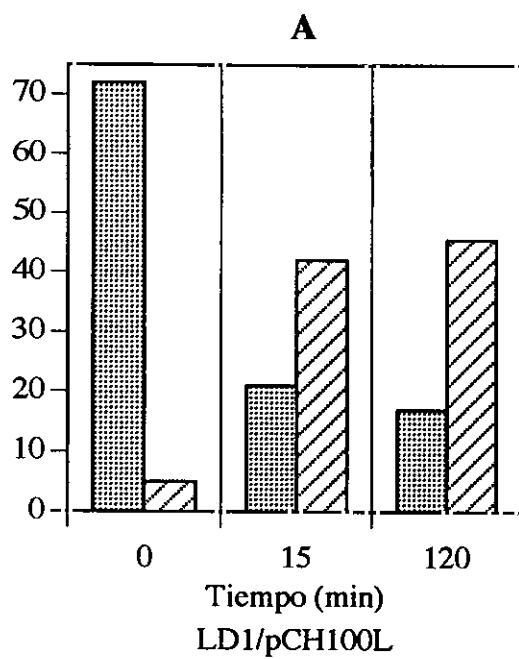
Tras los resultados expuestos anteriormente, nos planteamos estudiar si a lo largo del tiempo, tras el choque ósmotico, se producía una liberación mayor de proteínas, una vez que sabíamos que la lisis sufrida por un elevado porcentaje de las células era inmediata. Medimos la cantidad de proteína liberada a los 15', igual que en el caso anterior, y tras dos horas de incubación de las células, sometidas a un choque osmótico. Empleamos dos cepas sensibles al choque osmótico, LD1 y LHDP1, transformadas con el plásmido pCH100L. Los resultados se muestran en los diagramas de barras de la figura 39. En ellos no se observan diferencias significativas entre las medidas obtenidas tras 15' y 120' de incubación. Esta observación, permite concluir que la liberación de proteínas tras el choque osmótico es inmediata, al igual que la lisis.


3.5. Concentración de proteínas liberadas mediante un choque osmótico.

Los experimentos descritos anteriormente se realizaron resuspendiendo las células en el mismo volumen en que había sido realizado el cultivo. Nos planteamos la posibilidad de realizar choques osmóticos resuspendiendo las células en un menor volumen respecto del inicial, con el fin de obtener las preparaciones de proteínas más concentradas, sin disminuir el porcentaje de lisis obtenido. La densidad óptica de los cultivos sometidos a choque osmótico oscilaba entre densidad óptica 1.5-3. Para realizar esta concentración, se resuspendieron los cultivos en proporciones de 5 DO/ml y 10 DO/ml, así por ejemplo un cultivo de densidad óptica 2 con un volumen de 100 ml tras el choque osmótico era resuspendido en 40 ml (5 DO/ml) ó en 20 ml (10 DO/ml).

Los resultados del experimento se muestran en la figura 40, representando por medio de diagramas de barras las cantidades de proteínas totales (Fig. 40, panel A) y de actividad enzimática CAT (Fig. 40, panel B), liberadas al medio de cultivo en las cepas LD1 y LHDP1; todas ellas transformadas con el plásmido de expresión pCH100L. En ambos intentos de concentración no se observaron diferencias significativas en las cantidades liberadas al caldo, que fueron proporcionalmente parecidas a las logradas en choques osmóticos realizados anteriormente (Figs. 38 y 39). Esta nueva aproximación nos permite trabajar con cantidades inferiores en 1.5-5 veces el volumen de cultivo inicial, y obtener preparaciones de proteínas más concentradas, en torno a 0.5-1 mg de proteínas totales; ambos hechos, contribuyen a facilitar un posible proceso de purificación de una proteína de interés presente en la mezcla cruda de proteínas obtenida por este método.

Figura 39. Liberación de la proteína CAT en el tiempo, tras un choque osmótico, en las cepas LD1 y LHDP1 transformadas con el plásmido pCH100L. Paneles A y B medida de la proteínas totales presentes en el extracto celular y el sobrenadante del medio de cultivo ($\mu\text{g}/\text{DO}$) antes y después del choque osmótico. Paneles C y D, medida de la actividad CAT (UE/DO) en idénticas condiciones. El tiempo cero representa los valores obtenidos en medio estabilizado osmóticamente, antes de realizar el choque osmótico.



 Extracto celular


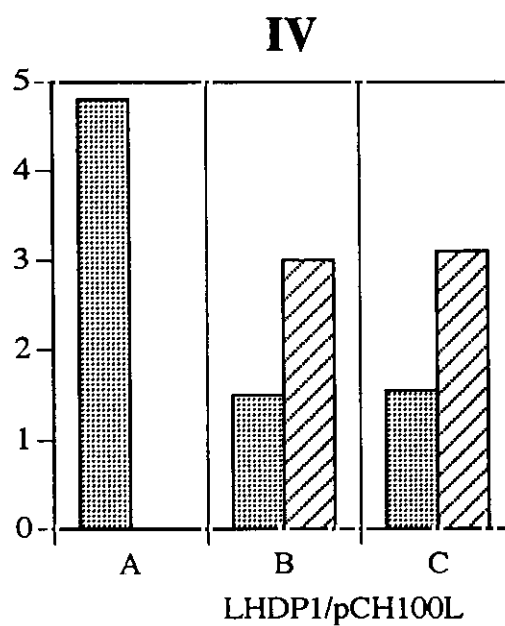
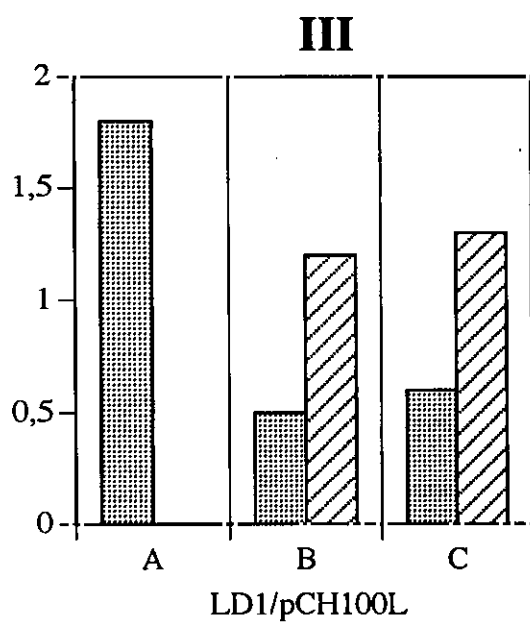
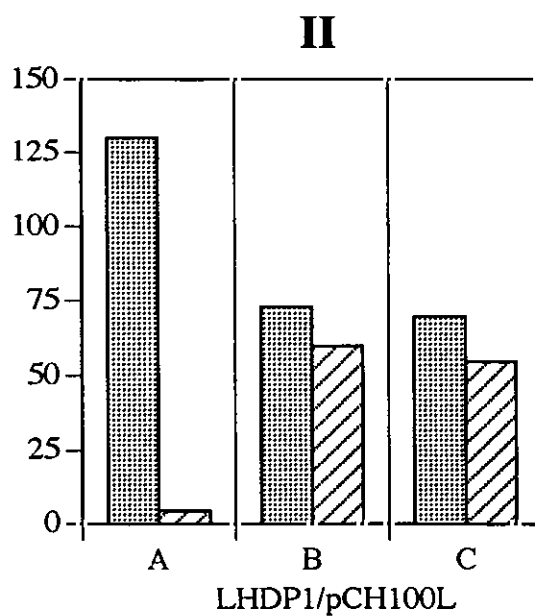
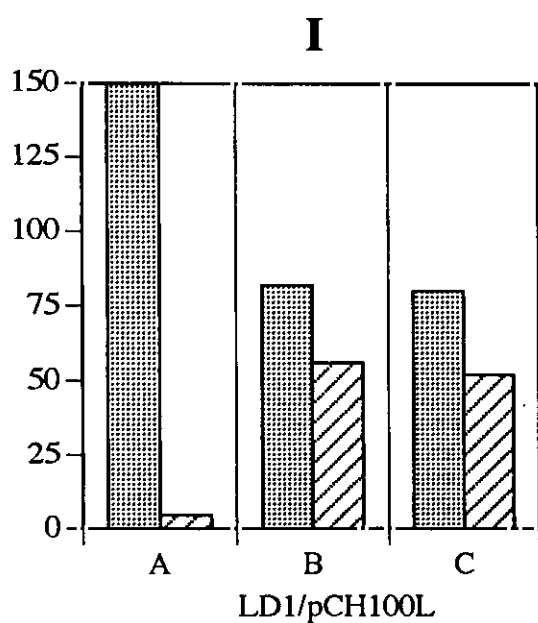


 Sobrenadante de cultivo

Figura 40. Liberación de la proteína CAT en el tiempo, tras un choque osmótico, en las cepas LD1 y LHDP1 transformadas con el plásmido pCH100L. Influencia de la concentración de las muestras en la eficiencia de la liberación al medio de cultivo. Paneles I y II medida de las proteínas totales presentes en el extracto celular y medio de cultivo, antes y después del choque osmótico. Paneles III y IV, medida de la actividad CAT en idénticas condiciones.



A: medidas en medio con sorbitol
 B: medidas en solución tampón a 5 DO/ml
 C: medidas en solución tampón a 10 DO/ml

 Extracto celular
 Sobrenadante solución tampón

4. LIBERACIÓN DE VLPs (VIRUS-LIKE PARTICLES) EN MUTANTES AUTOLÍTICOS DE *S. cerevisiae*.

Se ha descrito, en un apartado anterior, la capacidad de los mutantes autolíticos *slt2* para liberar proteínas por medio de un choque osmótico. A continuación, ensayamos la capacidad de los mutantes para liberar la proteína multimérica VLP, formada por 300 subunidades de la proteína p1, que forma partículas en el interior de las células de *S. cerevisiae*, semejantes a las formadas por los virus con un diámetro aproximado de 60 nm (Kingsman *et al.*, 1991).

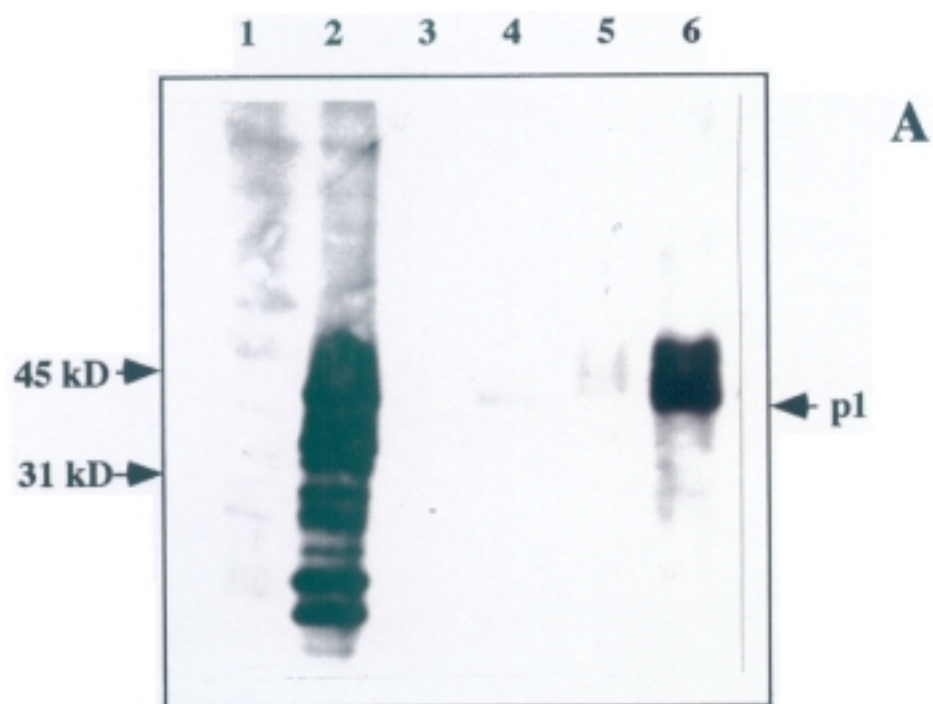
Disponíamos en nuestro laboratorio del plásmido pMA5620 (Adams *et al.*, 1987) que posee el gen *TYA* de la proteína p1 bajo el promotor del gen *PGK* (cedido por el Dr. A.J. Kingsman). Se transformó la cepa LD1 por el método de protoplastos por tratarse de un plásmido con el marcador de selección *LEU2-d*. Tras un crecimiento a 37°C durante 16 h, se recogieron las células por centrifugación y resuspendiéndose en un buffer Tris 10 mM pH 7.5, para provocar la lisis del cultivo por choque osmótico. Se realizó una electroforesis, con muestras de sobrenadante obtenidas antes y después del choque osmótico para, tras transferir las proteínas a una membrana, realizar un "Western blot" frente a un anticuerpo policlonal, anti-VLP (dilución 1/25000). Los resultados muestran la presencia en extractos celulares de la proteína p1, demostrando el correcto funcionamiento del vector (Fig. 41A, calle 2). En el carril correspondiente al sobrenadante de las células en presencia de sorbitol se observa una banda tenue (Fig. 41A, calle 5), por la liberación debida al pequeño porcentaje de células lisadas (5%) en estas cepas, incluso en presencia de estabilizador osmótico (Fig. 41B, panel A), en cambio, en el carril correspondiente al sobrenadante tras el choque osmótico, se observa una banda once veces más intensa, calculada por densitometría, correspondiente a la proteína p1 (Fig. 41A, calle 6), y se observa que la lisis celular en ese momento era del 80% (Fig. 41B, panel B). Dichas bandas presentan igual migración electroforética que la proteína p1 pura (Fig. 41A, calle 4).

Por lo tanto, el choque osmótico en las cepas *slt2* parece apto para lograr la liberación de VLPs.

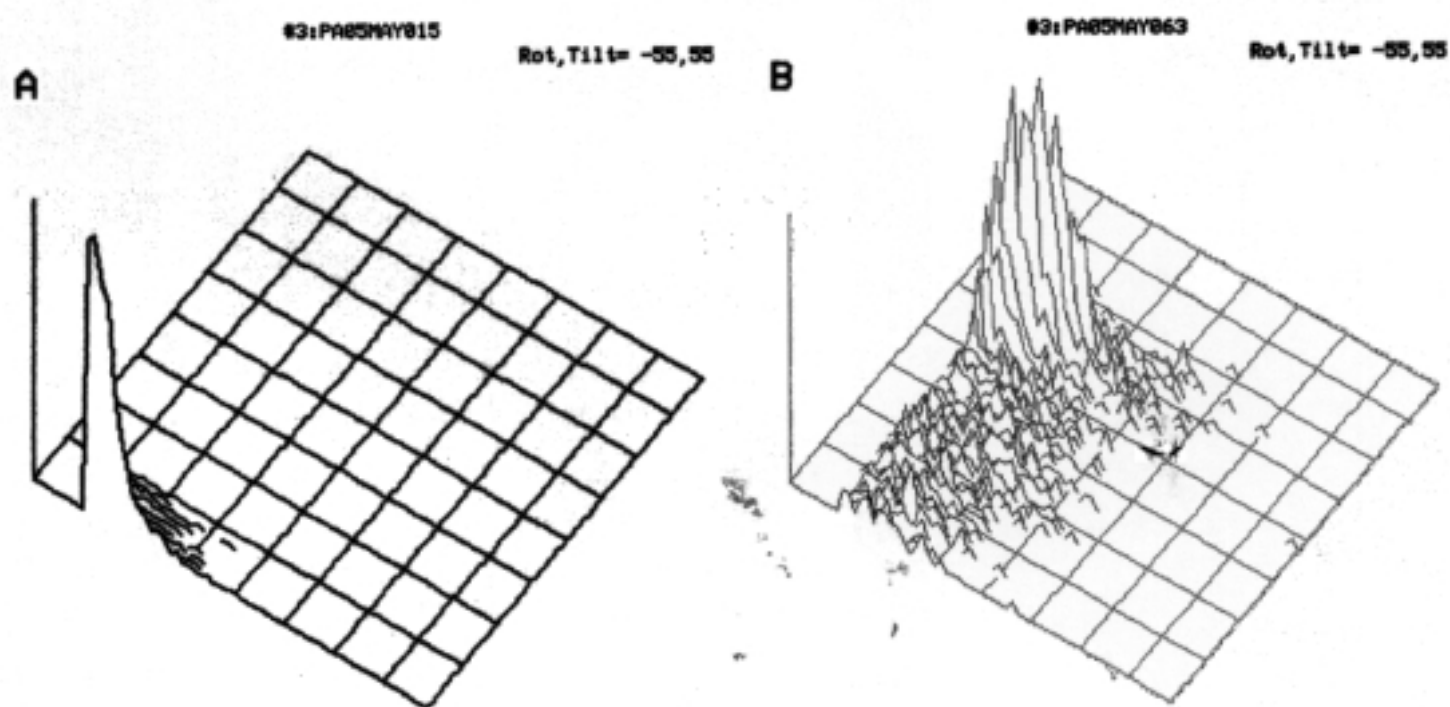
5. CLONACIÓN DEL GEN HOMÓLOGO DE *SLT2* DE *S. cerevisiae* EN LA LEVADURA *P. pastoris*.

Durante los últimos años se ha progresado mucho en el conocimiento de otras especies de levadura, diferentes de *S. cerevisiae*, tradicionalmente usadas a nivel industrial. Entre éstas destaca la especie *P. pastoris*, que ha alcanzado un elevado uso como hospedador para la producción de proteínas heterólogas. Por ello, tratamos de ampliar el sistema de liberación de proteínas heterólogas, iniciado en *S. cerevisiae*, a la levadura *P. pastoris*. El primer paso, consiste en tratar de clonar el gen homólogo de *SLT2* en *P. pastoris*, y estudiar si la mutación en dicho gen produce un fenotipo similar al descrito para *S. cerevisiae*.

Figura 41. Liberación de VLPs. Panel A, análisis mediante "Western blot" de VLPs; calle 1, extracto celular de la cepa LD1; calle 2, extracto celular de LD1/pMA5620; calle 3, patrón de pesos moleculares; calle 4, VLP pura; calle 5, sobrenadante de LD1/pMA5620, en medio estabilizado osmóticamente; calle 6, sobrenadante de LD1/pMA5620, tras choque osmótico. Panel B, efecto de un choque osmótico en la viabilidad de la cepa LD1/pMA5620 creciendo a 37°C en medio estabilizado con sorbitol 1 M (A), y resuspendido en agua (B), determinado por citometría de flujo.



B



5.1. Hibridaciones DNA-DNA heterólogas.

Estos experimentos tenían por objetivo tratar de determinar la presencia de algún gen que tuviera homología, a nivel de DNA, con el gen *SLT2* de *S. cerevisiae*, en el genoma de la levadura *P. pastoris*.

La sonda elegida para realizar el experimento fue un fragmento de 456pb del gen *SLT2*, amplificado con los oligonucleótidos degenerados T5 y T6 mediante PCR. Las hibridaciones se realizaron, a la temperatura de 55°C, frente al DNA genómico de la cepa silvestre de *P. pastoris* NRRLY-11430, digerido con diferentes endonucleasas de restricción. Como controles se utilizaron: DNA genómico de la cepa BJ5464 de *S. cerevisiae* digerido con Eco RI y DNA genómico de la cepa silvestre 1001 de *C. albicans* digerido con EcoRI, ya que en nuestro laboratorio se había clonado el gen *MKC1* de esta especie, como homólogo del gen *SLT2* (Navarro *et al.*, 1995). Los resultados se muestran en la figura 42A. Se observa una banda intensa de 3 Kb en el carril correspondiente al DNA genómico de *S. cerevisiae* (calle 6), correspondiente a la hibridación con el gen *SLT2*; en el carril de *C. albicans* también se observa una banda de 6 Kb más intensa, correspondiente al gen *MKC1* de esa especie (calle 1), lógicamente de menor intensidad. En los carriles correspondientes al DNA genómico de *P. pastoris* (calles 2 a 5), se observan bandas de diferentes tamaños, estas bandas pueden ser atribuibles a la presencia de un gen homólogo de *SLT2* en el genoma de *P. pastoris*.

5.2. Desarrollo de una sonda genética para la clonación del gen homólogo de *SLT2* en *P. pastoris*.

Se pensó en desarrollar una sonda genética para llevar a cabo la clonación de dicho gen. Una vez desarrollada dicha sonda, disponíamos en nuestro laboratorio de una genoteca genómica de *P. pastoris* en un vector de *E. coli* (cedida por el Dr. Cregg) sobre la que podíamos realizar una hibridación en colonia.

Para obtener la sonda mediante PCR se diseñaron unos oligonucleótidos degenerados para los dominios más conservados de la proteína codificada por el gen *SLT2*. La proteína Slt2p pertenece a la familia de las quinasas MAP, que presentan una serie de dominios conservados entre las diferentes proteínas de dicha familia. Concretamente se aprovecharon el subdominio II, de unión de ATP, y el subdominio VIII, utilizando en el oligonucleótido el triplete consenso Ala-Pro-Glu (Ala²⁰⁰-Pro²⁰¹-Glu²⁰² en Slt2p), estos son los residuos del dominio catalítico consenso en serín-treonín quinasas (Torres *et al.*, 1991). La amplificación entre ambas zonas corresponde a un fragmento de DNA, en el gen *SLT2*, de un tamaño de 456 pares de bases. Los oligonucleótidos degenerados utilizados fueron:

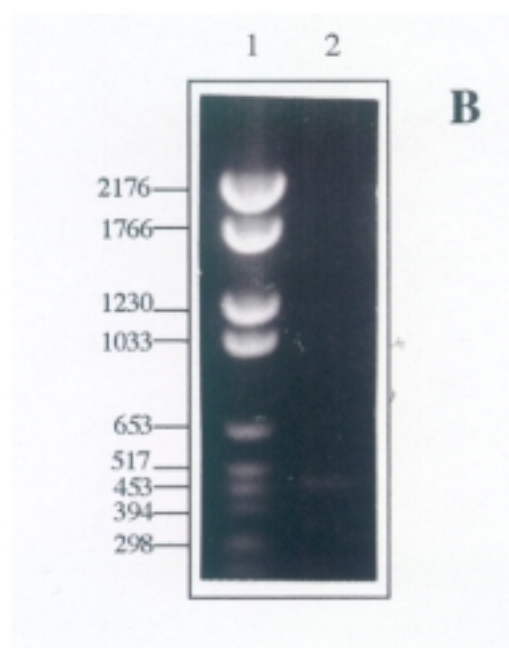
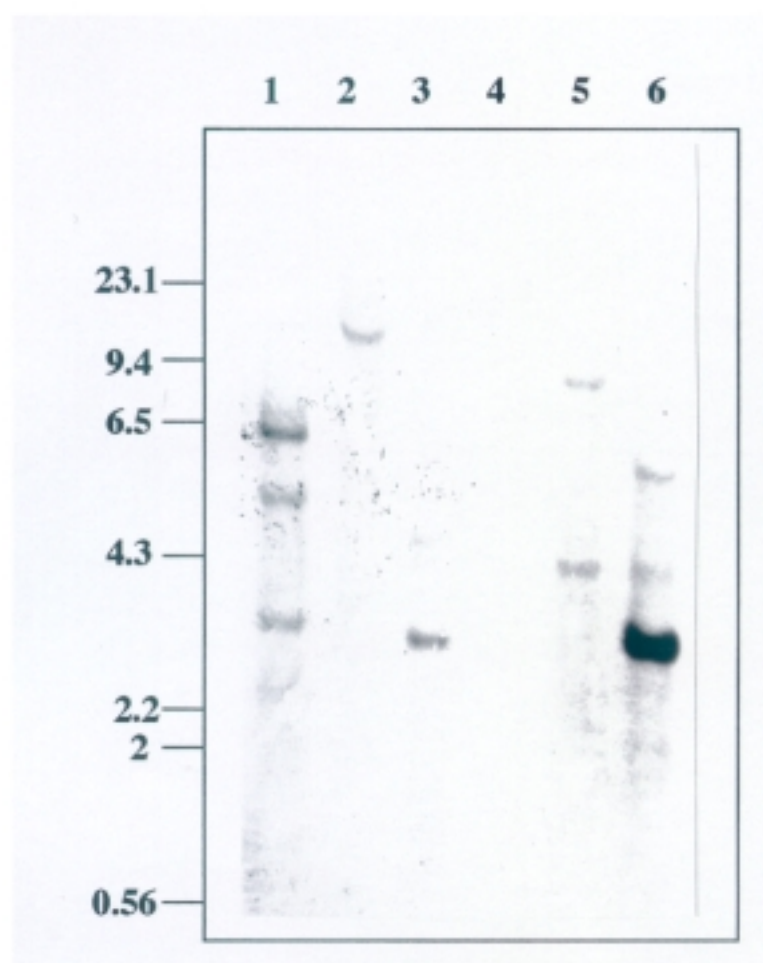
Oligonucleótido T5, homólogo del dominio II:

5' CCGGAATTCTGtagtGCacgtATctaAAagAgaAT 3' (*)

EcoRI

Figura 42. (A) Hibridación DNA-DNA heteróloga, con la sonda del gen *SLT2* de *S. cerevisiae*. Calle 1, DNA genómico de la cepa 1001 de *C. albicans*, digerido con EcoRI; calles 2, 3, 4 y 5, DNA genómico de la cepa NRRLY-11430 de *P. pastoris*, digerido con BamHI, HindIII, Sall y EcoRI respectivamente; calle 6, DNA genómico de la cepa BJ5464 de *S. cerevisiae*, digerido con EcoRI.

(B) Amplificación mediante PCR del DNA genómico de la cepa silvestre NRRLY-11430 de *P. pastoris*, con los oligonucleótidos degenerados T5 y T6 (calle 2); patrón de tamaños de DNA, pBR328 digerido con BglI y HinfI (calle 1).



Oligonucleótido T6, homólogo del dominio VIII:

5' CTCGAATCCTCagctGGacgtGCacgtCgtgaTACCA 3' (*)

BamHI

(*) Las letras en minúscula corresponden a las bases degeneradas.

Con dichos oligonucleótidos procedimos a realizar una PCR con una temperatura de hibridación de 50°C durante el primer ciclo, y de 55°C el resto de los ciclos, hasta completar un total de 30 ciclos. El DNA molde utilizado fue DNA genómico de *P. pastoris*, cepa NRRLY-11430. Tras la amplificación, obtuvimos bandas del tamaño esperado, aproximadamente 450-500 pares de bases (Fig. 42B). Dichos fragmentos de DNA fueron clonados, en el vector pT7, con el objeto de proceder a su secuenciación.

Los resultados de la secuenciación de los productos obtenidos demuestran la amplificación de dos proteínas quinasas: una MAP quinasa, clon P23, y de una proteína quinasa diferente, clon P16. Una vez realizadas las homologías a nivel de DNA y de proteína de los productos amplificados, el clon P23 mostró la mayor homología con los productos de los genes de MAP quinasas *FUS3* y *KSS1* de *S. cerevisiae* con 72.8% y 70.1% de homología respectivamente, frente a un 57.8% con la MAP quinasa *SLT2* (Fig. 43). El clon P16 era homólogo de la quinasa codificada por el gen *CDC28* de *S. cerevisiae* (Lorincz y Reed, 1984). En la figura 44, se presenta un dendograma de los clones P23 y P16, en el que se pueden observar las homologías de esos clones con varias MAP quinasas de levadura. Se analizaron varios clones, no obteniéndose una homología mayoritaria con la quinasa correspondiente al gen *SLT2* de *S. cerevisiae*.

Por lo tanto, parece existir un gen homólogo al gen *SLT2* de *S. cerevisiae* en el genoma de *P. pastoris*; no obstante no se logró amplificar con los oligonucleótidos degenerados. Por ello aprovechando la funcionalidad de los genes de *P. pastoris* en *S. cerevisiae* se intentará su clonación por medio de una genoteca genómica de *P. pastoris* en un vector de *S. cerevisiae* (cedida por el Dr. William Payne, MIT, USA) sobre un mutante de *slt2* de *S. cerevisiae*.

Figura 43. Homologías del clon P23 de *P. pastoris* con las MAP quinasas de *S. cerevisiae* Fus3p, Kss1p y Slt2p. El asterisco representa los aminoácidos conservados en esta familia de proteínas.

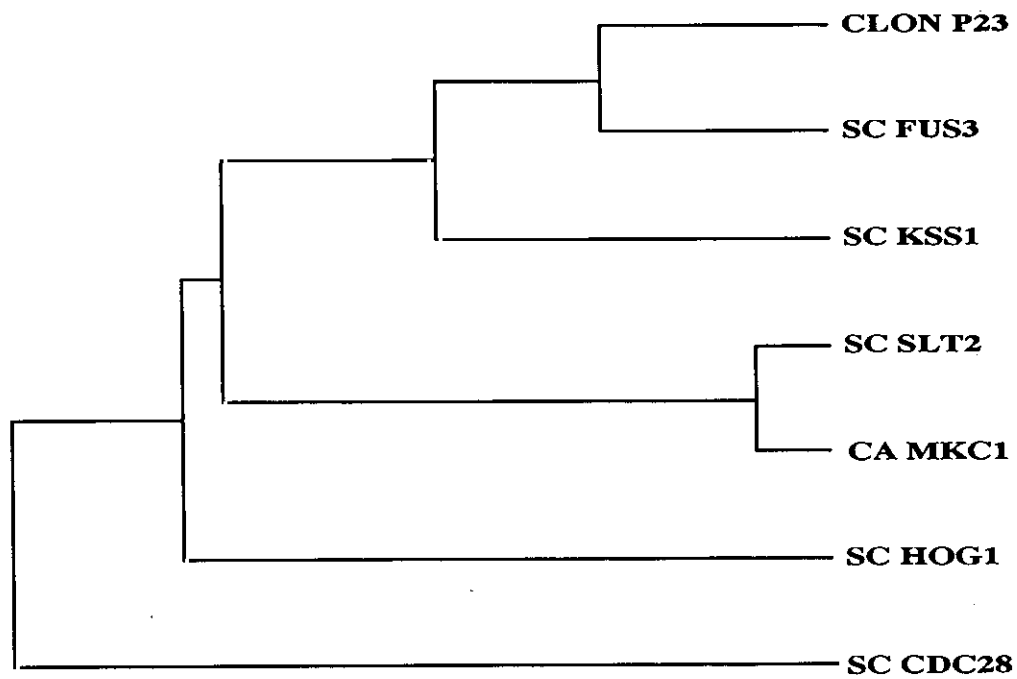
```

CLONP23      - VAIKKIVPFSKPMFCLRTLRELKLLKHFNHENIISILDIQVPYDFSSFHE -50
               |||||  |||  |||||  |||||  |||||  |||  |  |  |  |
SCFUS3PCR    - VAIKKIEPFDKPLFALRTLREIKILKHIFKHENIITIFNIQRPDSFENFNE -50
               **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
CLONP23      - VYLIQELMETDLHRVIRTOQLSDDHCQYFVYQTLRALKALHSANVLHRLD -100
               ||  ||||  |||||  ||  ||||  ||  |||||  |  ||  ||||
SCFUS3PCR    - VYIIQELMQTDLHRVISTQMLSDDHIIQYFYIYQTLRAVKVLHGSNVIIHRLD -100
               *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
CLONP23      - KPSNLLLNANCDLKVCDLGLARSVAKTEDNYG-----FMTEYVATRWY -143
               |||||  |  |||||  |||||  |||||  |||||  ||||
SCFUS3PCR    - KPSNLLINSNCDLKVCDLGLARIIDESAADNSEPTGQQSGMTEYVATRWY -150
               **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
CLONP23      - RAPE -147
               ||||
SCFUS3PCR    - RAPE -154      Homología 72.8%
               *  *  *

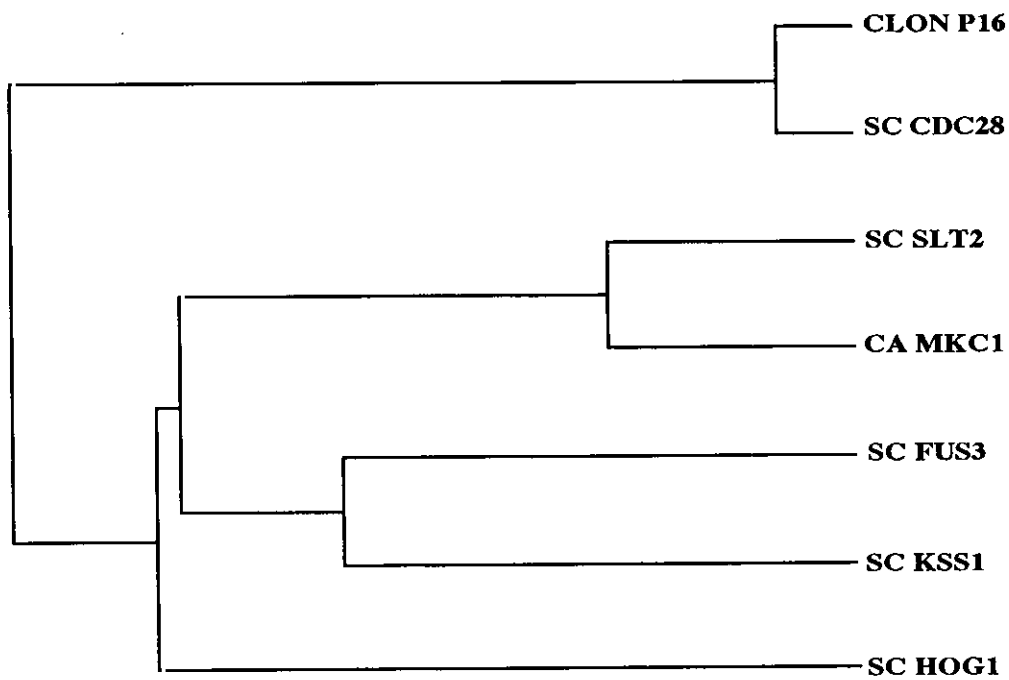
```

Figura 44. Dendograma de los alineamientos de los clones P23 (A) y P16 (B) de *P. pastoris* con varias MAP quinasas de levadura. Leyenda: SC, *S. cerevisiae*; CA, *C. albicans*.

A



B



6. EXPRESIÓN DE HLA-DP EN *S. cerevisiae* Y LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFEROS.

A diferencia de las moléculas de clase I, que son fácilmente liberadas a partir de la membrana citoplásmica (Garret *et al.*, 1989), las moléculas de clase II no pueden purificarse con facilidad. Por tanto, cualquier método que permitiera la obtención de estas moléculas en forma soluble, facilitaría los estudios estructurales de las mismas y la posibilidad de incrementar los conocimientos sobre la presentación de antígenos. El sistema elegido, para esta expresión heteróloga, fue inicialmente la levadura *S. cerevisiae*, por ser conocido su manejo en nuestro laboratorio y disponer del material adecuado para llevar a cabo los experimentos.

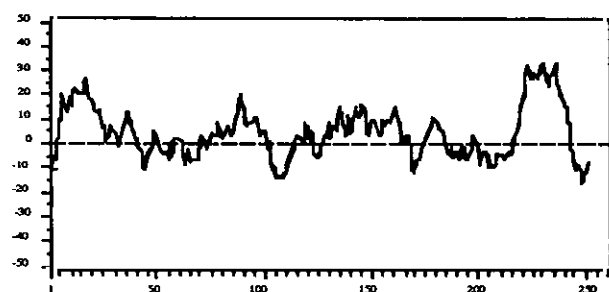
6.1. Desarrollo de formas solubles de HLA-DP.

La proteína presentadora de antígeno HLA-DP, de clase II, es un heterodímero formado por dos glicoproteínas transmembranales, asociadas de forma no covalente: una cadena α de 29.3 kD y una cadena β de 29.2 kD, poseyendo cada una de estas cadenas dos dominios (α_1 y α_2 , β_1 y β_2) que están unidos por puentes disulfuro. En ambas cadenas, existe un péptido de conexión de 13aa (α) y 12aa (β), que une los dominios extracelulares con la región de transmembrana de la proteína, que a su vez se conecta con una cola intracitoplásmica. Los alelos de HLA-DP con los que se llevó a cabo el trabajo fueron DPA1*0103 (DP- α) y DPB1*02012 (DP- β).

Se denominan formas solubles de la proteína HLA-DP, a las que carecen de las regiones de transmembrana y citoplásmica. Para obtener estas formas solubles empleamos la técnica de PCR. En la figura 45, se observan los perfiles hidrofóbicos de las cadenas DP- α , DP- β , así como de las formas solubles de las mismas, en las que se observa la desaparición de las regiones hidrofóbicas correspondientes al dominio de transmembrana. La región hidrofóbica, observada en la zona aminoterminal de la proteína, corresponde al péptido señal. Esta región es la encargada de asegurar la translocación de la proteína al retículo endoplásmico, para garantizar el correcto procesamiento de la misma: ensamblaje y glicosilación de ambas cadenas. Hemos decidido mantener el péptido señal de la proteína HLA-DP ya que se han descrito casos de expresión heteróloga de proteínas en *S. cerevisiae* en los que el péptido señal de la proteína heteróloga dirigía una correcta translocación al retículo endoplásmico. Además, de esta forma podíamos usar indistintamente estas formas solubles para realizar la expresión heteróloga en células de mamífero.

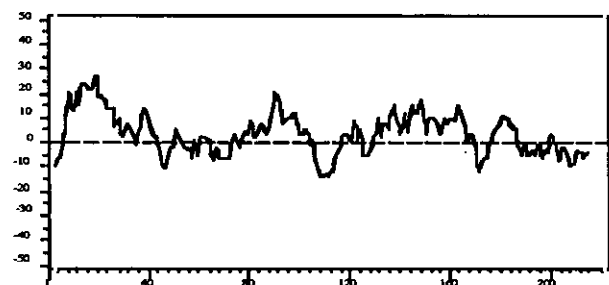
El abordaje experimental consistió en diseñar unos oligonucleótidos que nos permitieran amplificar las regiones de ambos genes, DPA1*0103 (DP- α) y DPB1*02012 (DP- β), que codificaban para los dominios externos de ambas cadenas de la proteína. Los oligonucleótidos se diseñaron con dianas BglII en sus extremos para permitir la posterior clonación en los vectores de expresión, en los oligonucleótidos α -35 y β -35 se introdujo un codón de terminación. Los oligonucleótidos empleados fueron:

Figura 45. Perfiles hidrofóbicos de las cadenas α y β de HLA-DP. (A) Cadena α completa; (B) cadena α soluble; (C) cadena β completa; (D) cadena β soluble; (E) proteína quimérica $\alpha\beta$ soluble.



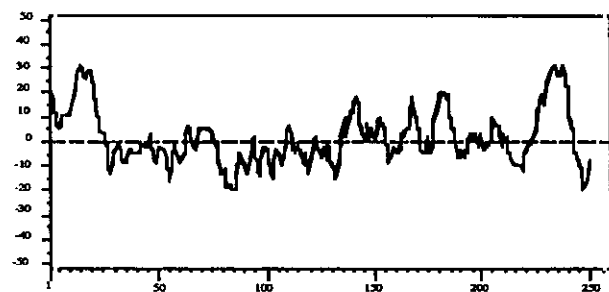
A

DPA*0103
indice -0.1



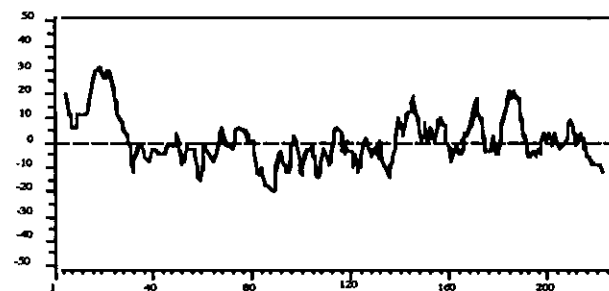
B

DPA*0103sol
indice -2.13



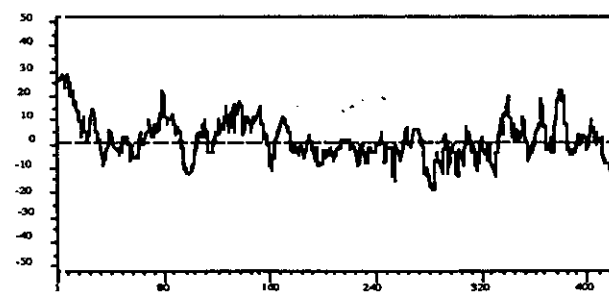
C

DPB*02012
indice -3.2



D

DPB*02012sol
indice -4.45



E

DPA*0103sol-DPB*02012sol
indice -4.32

-para amplificar la cadena α :

Oligonucleótido ss- α

5' GGAGATCTATGCGCCCTGAAGACAG 3'

BglII

Oligonucleótido α -35:

5' GCAGATCT**TC**ACTCCGTTGTCTCAGGCATCTGG 3'

BglII En negrita el codón de terminación

-para amplificar la cadena β :

Oligonucleótido ss- β :

5' GGAGATCTATGATGGTTCTGCAGG 3'

BglII

Oligonucleótido β -35:

5' CGCAGATCT**TC**ATGTCTTACTCCGGGCAG 3'

BglII En negrita el codón de terminación

En la figura 46, se muestra la estrategia seguida para obtener los genes truncados, que codifican para las formas solubles de ambas cadenas, de la proteína HLA-DP del complejo principal de histocompatibilidad de clase II humano. La PCR se realizó según se describe en Materiales y Métodos (4.14). La nomenclatura empleada para designar los genes truncados de las formas solubles obtenidas por PCR fue:

-DP α_s , para el gen truncado de la cadena α , con un tamaño de 669 nucleótidos y una proteína de 25556 daltons de peso molecular.

-DP β_s , para el gen truncado de la cadena β , con un tamaño de 681 nucleótidos y una proteína de 25978 daltons de peso molecular.

Los fragmentos de DNA, obtenidos en las amplificaciones de PCR, se subclonaron por extremos romos, previa eliminación de la extensión de adenosina en 3', en la diana SmaI del plásmido pUC19 para proceder a su secuenciación, con el objeto de comprobar la fidelidad de la amplificación, generándose los plásmidos pUC19-DP α_s y pUC19-DP β_s . En ambos casos se secuenciaron tres de los fragmentos amplificados de cada una de las cadenas, obteniéndose uno de ellos de cada cadena, sin errores en la secuencia de los mismos.

6.1.1. Desarrollo de un vector de expresión de *S. cerevisiae* para las formas solubles de HLA-DP.

Con el objetivo de evitar cotransformar la levadura con dos plásmidos de expresión diferentes, uno para cada gen, decidimos construir un vector de expresión que portase dos cassettes de expresión con ambos genes DP α_s y DP β_s , al igual que en el caso de la producción de hemoglobina en *S. cerevisiae* (Wagenbach *et al.*, 1991).

Figura 46. Obtención, mediante amplificación con PCR, de las formas solubles de HLA-DP. Calle 1, patrón de tamaños de DNA, pBR328 digerido con BglI y HinfI; calle 2, DP α soluble; calle 3, DP β soluble.

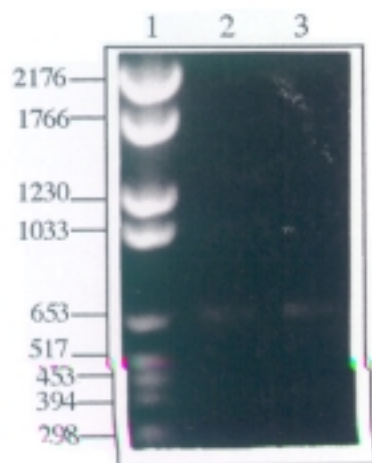
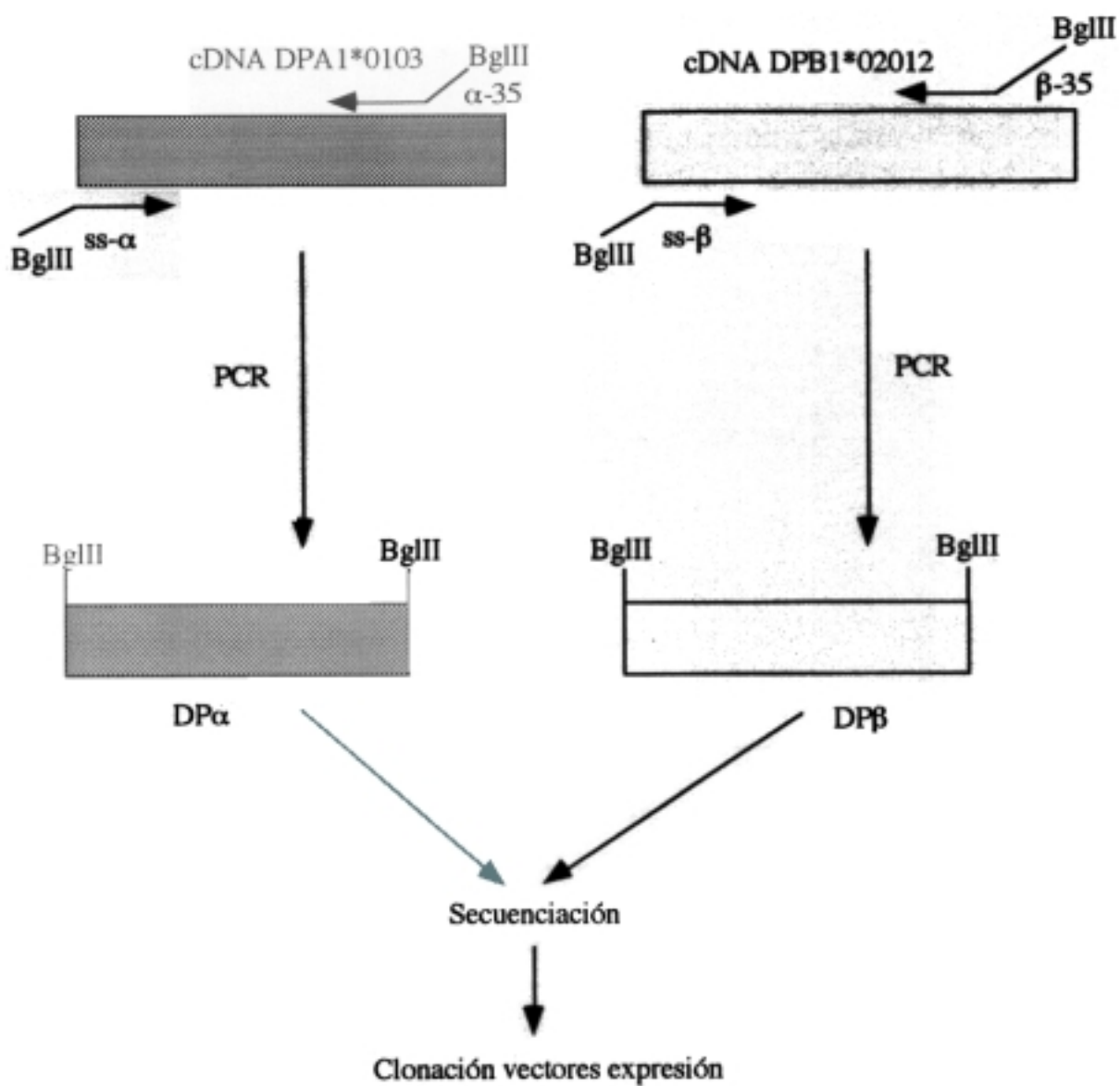
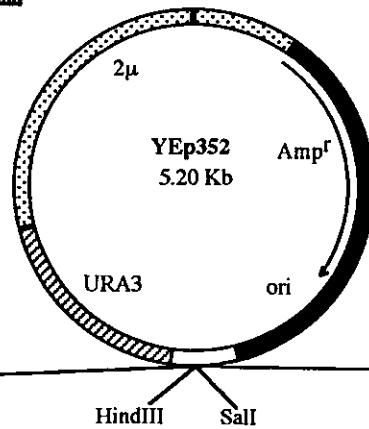
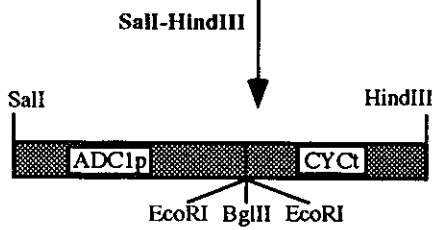
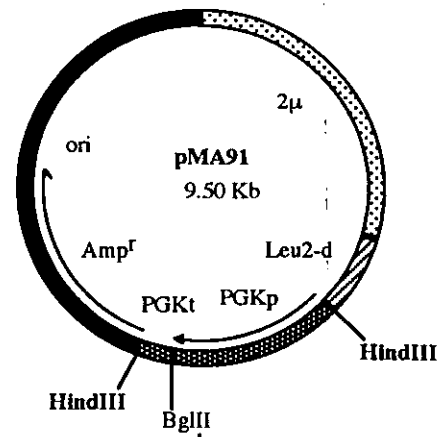
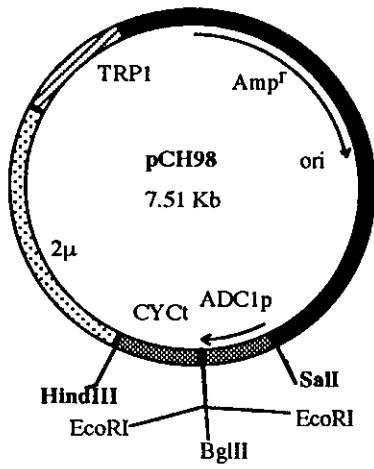


Figura 47. Construcción de los plásmidos YEpADC1 y YEpPGK.



T4 DNA ligasa

T4 DNA ligasa

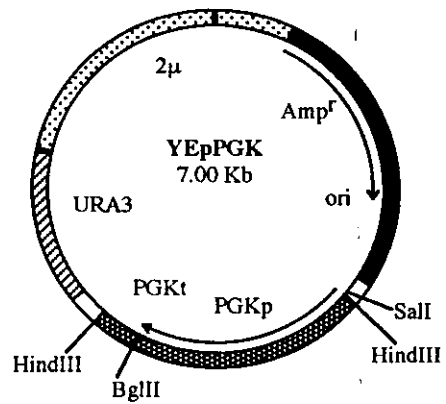
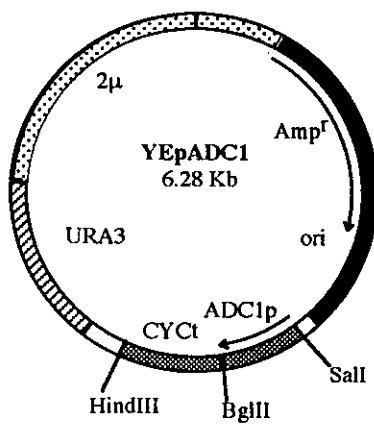


Figura 48. Construcción de los plásmidos YEpPGK β_s y YEpADC1 α_s .

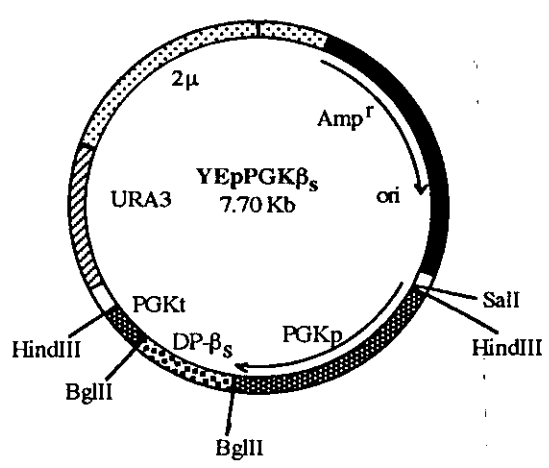
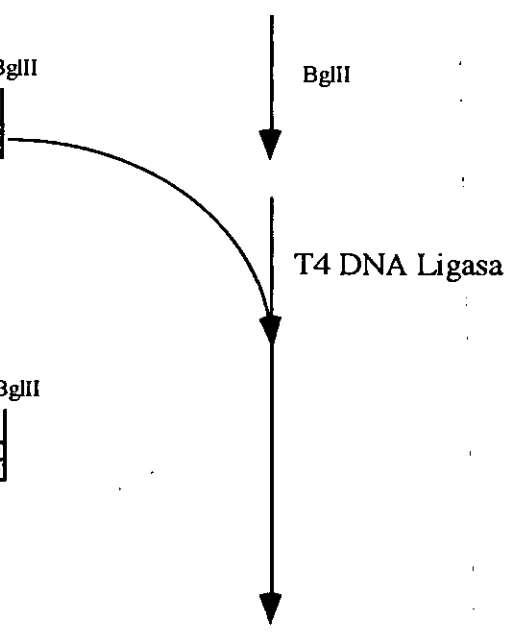
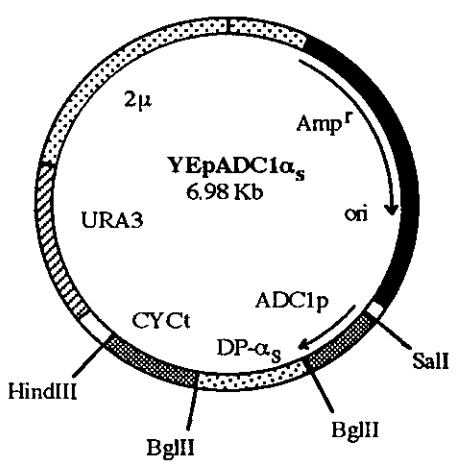
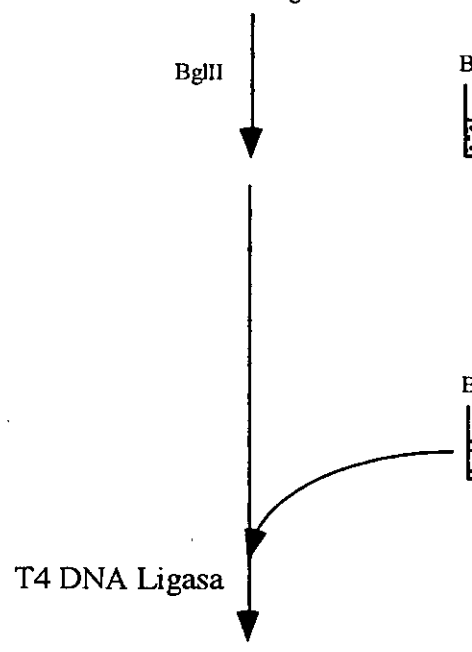
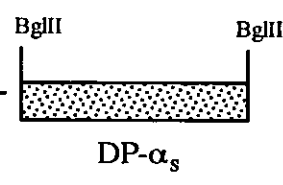
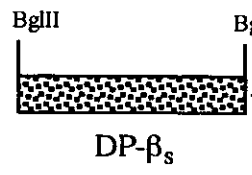
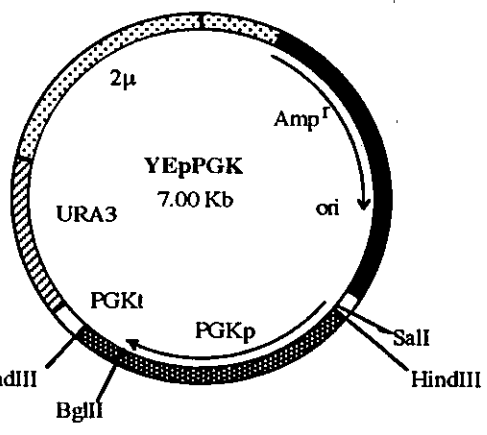
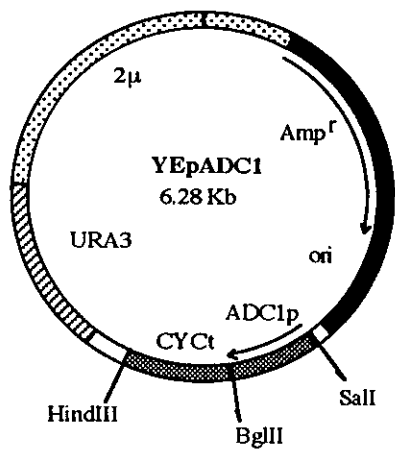
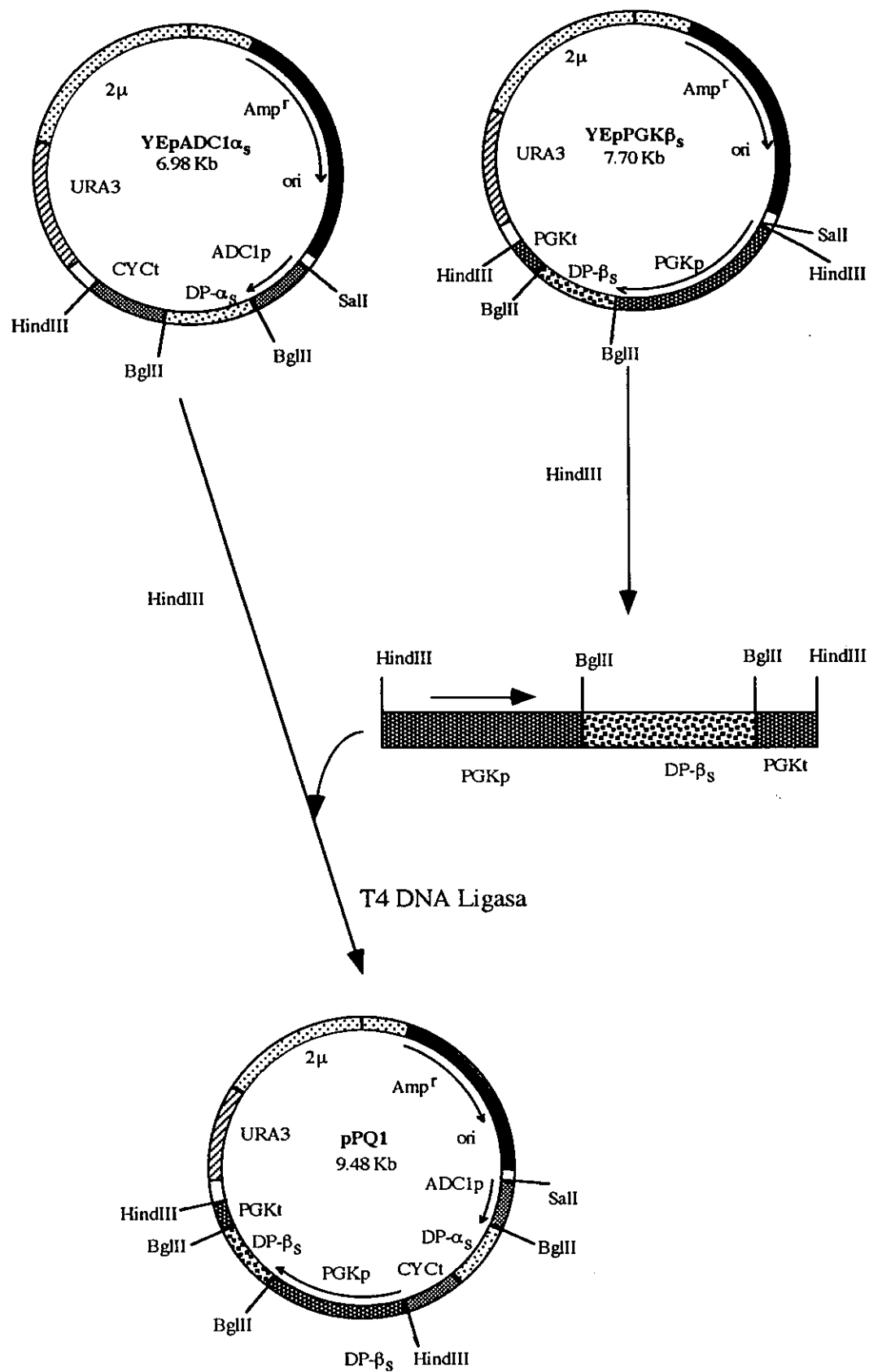


Figura 49. Construcción del plásmido pPQ1.



Disponíamos en el laboratorio de dos plásmidos con cassettes de expresión en *S. cerevisiae*, pMA91 (Mellor *et al.*, 1983) con la cassette de expresión de PGK (fosfoglicerato quinasa) y pCH98 (Hadfield *et al.*, 1986) con la cassette de expresión ADC1 (Alcohol deshidrogenasa I). En primer lugar procedimos a subclonar ambas cassettes en el plásmido YEp352, generándose los vectores YEp352PGK y YEp352ADC1. Los pasos realizados para obtener dichos vectores se esquematizan en la figura 47. Para obtener el plásmido YEp352PGK, extrajimos la cassette PGK del plásmido pMA91 cortando con la endonucleasa de restricción HindIII, que genera un fragmento de 1.8 Kb que contiene la región promotora y terminadora con un sitio de clonación BglII, y se introdujo en la diana HindIII del plásmido YEp352. Por otro lado, extrajimos la cassette ADC1 digiriendo el plásmido pCH98 con las endonucleasas Sall-HindIII, obteniéndose un fragmento de 1.1 Kb que portaba la región promotora ADC1 y la región terminadora CYC1 con sitios de clonación BglII y EcoRI, que se subclonó en el plásmido YEp352 digerido con dichas enzimas, generándose el plásmido YEp352ADC1.

A continuación los DNAs de los genes $DP\alpha_s$ y $DP\beta_s$, obtenidos por PCR, que habían sido seleccionados por caracer de errores en su secuencia, fueron subclonados en los plásmidos YEp352PGK y YEp352ADC1. Para ello, digerimos los plasmidos pUC19- $DP\alpha_s$ y pUC19- $DP\beta_s$ con la enzima de restricción BglII, que extraía los genes $DP\alpha_s$ y $DP\beta_s$ que se introdujeron en YEp352ADC1 y YEp352PGK, cortados con el mismo enzima de restricción, respectivamente según se indica en la figura 48, generándose los nuevos plásmidos YEp352-ADC1- $DP\alpha_s$ y YEp352-PGK- $DP\beta_s$. Posteriormente, se digirió el plásmido YEp352PGK- $DP\beta_s$ con la endonucleasa HindIII extrayendo un fragmento de 2.5 Kb que comprendía la cassette de expresión PGK con el gen $DP\beta_s$ clonado en la diana BglII, y se introdujo a continuación en la diana HindIII del plásmido YEp352ADC1- $DP\alpha_s$, creándose el plásmido pPQ1 (Fig. 49). Este plásmido, que portaba ambas cassettes de expresión, era un plásmido de tipo episómico, es decir de alto número de copias en *S. cerevisiae*, lo que aseguraba una elevada dosis génica.

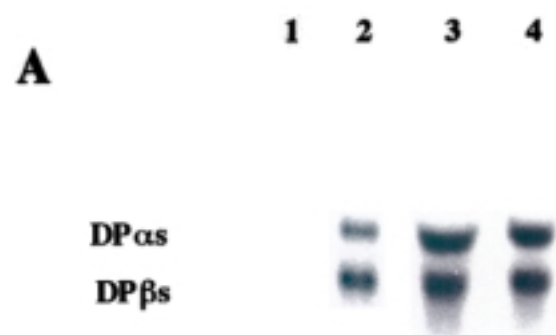
6.1.2. Estudio de la expresión de HLA-DP en *S. cerevisiae*.

6.1.2.1. Detección de mRNA de la forma soluble de HLA-DP.

El primer paso fue comprobar la presencia de mRNA de ambos genes en la levadura, para lo que realizamos un análisis de "Northern blot", usando como sonda ambos genes $DP\alpha_s$ y $DP\beta_s$. La cepa elegida de *S. cerevisiae* fue BJ5464, una cepa deficiente en proteasas vacuolares, que se transformó con el plásmido pPQ1. En la figura 50A, se muestra el resultado del experimento detectándose mRNA de ambos genes $DP\alpha_s$ y $DP\beta_s$ en tres transformantes diferentes, sin diferencias aparentes en el nivel de expresión entre ellos, ya que se cargaron iguales cantidades de RNA, por lo tanto el vector pPQ1 dirige eficientemente la transcripción de los genes $DP\alpha_s$ y $DP\beta_s$ en *S. cerevisiae*, y la cantidad de mRNA de ambos genes en cada transformante es similar como lo demuestra la intensidad de las bandas medida por densitometría, mostrando una intensidad similar para ambos genes (Fig. 50B).

Figura 50. (A) Análisis, mediante "Northern blot", de la expresión de las formas solubles de HLA-DP en *S. cerevisiae* usando el plásmido pPQ1. Calle 1, cepa BJ5464 sin transformar; calles 2, 3, 4, tres transformantes, T1, T2 y T3 de BJ5464/pPQ1, respectivamente.

(B) Análisis de la intensidad de las bandas mediante densitometría.



B

BJ5464/pPQ1	T1	T2	T3
DP α s	871	1044	557
DP β s	811	995	699

6.1.2.2. Detección de la proteína HLA-DP soluble.

Nos propusimos la detección la proteína HLA-DP soluble, formada por el ensamblaje de las cadenas $DP\alpha_S$ y $DP\beta_S$, en *S. cerevisiae* mediante Citometría de Flujo, realizando un marcaje intracitoplásmico de las proteínas en tránsito, ya que no era posible realizar un marcaje en superficie al tratarse de una proteína truncada carente de los dominios de anclaje en membrana. Las características de los anticuerpos monoclonales, de tipo monoespecífico disponibles en el laboratorio, obligaba a un correcto ensamblaje de ambas cadenas para que el epítipo reconocido por ellos adoptase una conformación correcta, no permitiendo los anticuerpos detectar ninguna de las cadenas por separado. La técnica, puesta a punto inicialmente con líneas celulares de mamífero, consistía en permeabilizar las células de *S. cerevisiae*, mediante un tratamiento con BFA, para permitir el acceso del anticuerpo monoclonal al interior de la célula. Para comprobar que la técnica funcionaba, con células de *S. cerevisiae*, se utilizó como control positivo en el experimento, un marcaje intracitoplásmico de la proteína intracelular Slt2p de *S. cerevisiae*. Con ello se comprobó que la permeabilización con BFA permitía el acceso del anticuerpo al interior de la célula, ya que éste era el paso crítico del protocolo.

Para realizar el experimento seleccionamos varios transformantes de la cepa BJ5464/pPQ1, crecidos en medio sintético Ura⁻ a 28°C, entre los que se encontraban los tres con los que se había realizado el experimento de "Northern blot". El control negativo del experimento fue la cepa BJ5464 sin transformar, y el control positivo la cepa L3c36c/YEp352PGK-SLT2, portadora del gen *SLT2* sobreexpresado. El anticuerpo monoclonal empleado en el experimento fue B7-21. Los resultados de la citometría se muestran en la figura 51. En el panel 1 se muestra el control positivo de la técnica empleando la cepa L3c36c/YEp352PGK-SLT2 que presenta una señal de emisión de fluorescencia claramente diferenciada de la emisión de fluorescencia basal. En el panel 2, se muestra la cepa BJ5464 sin transformar que no presenta emisión de fluorescencia; en los paneles 3 a 13 se muestran los transformantes BJ5464/pPQ1 con débiles señales de emisión de fluorescencia que equivalen a porcentajes de población que oscila entre el 3.8% (panel 3) al 10.8% (panel 4). Los paneles 3,4,5 correspondían a los transformantes empleados en el experimento de "Northern". Los resultados indican un bajo nivel de la proteína formada por el ensamblaje de ambas cadenas. Los resultados no eran reproducibles fácilmente, probablemente debido a la escasa cantidad de heterodímero formado.

Por ello nos planteamos otras estrategias:

- desarrollo de un gen quimérico de HLA-DP que codificase para ambas cadenas unidas por un adaptador sintético, para favorecer el correcto ensamblaje de ambas cadenas.

- intento de expresión de estas formas solubles de HLA-DP y del gen quimérico en líneas celulares de ratón.

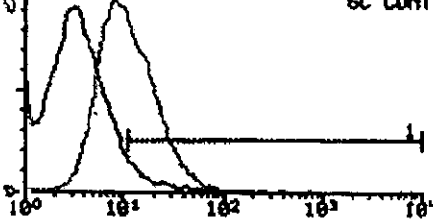
6.1.3. Clonación de HLA-DP soluble en vectores de expresión de células de ratón.

Pensamos que podía ser más fácil lograr la expresión y ensamblaje correcto de las formas solubles de HLA-DP en un sistema celular de expresión más evolucionado, ya que la causa más

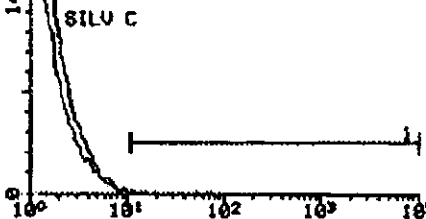
Figura 51. Detección de la proteína HLA-DP soluble en *S. cerevisiae*, mediante marcaje intracitoplásmico, usando citometría de flujo. Panel 1, control positivo de la técnica; panel 2, cepa BJ5464 sin transformar (control negativo); paneles 3 a 13, diferentes transformantes de la cepa BJ5464/pPQ1.

Panel 1	Panel 2	Panel 3
Panel 4	Panel 5	Panel 6
Panel 7	Panel 8	Panel 9
Panel 10	Panel 11	Panel 12
	Panel 13	

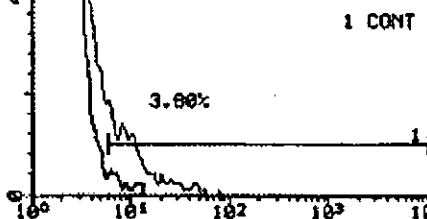
#11:/2/DP200CT001\FL1-H\FL1-Height
6C CONT



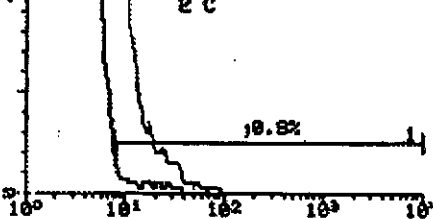
#11:/2/DP200CT003\FL1-H\FL1-Height
SILU C



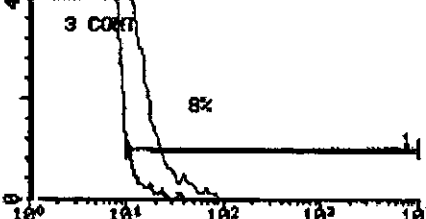
#11:/2/DP200CT006\FL1-H\FL1-Height
1 CONT



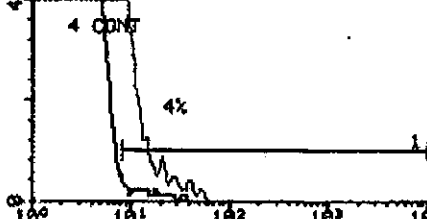
#11:/2/DP200CT008\FL1-H\FL1-Height
2 C



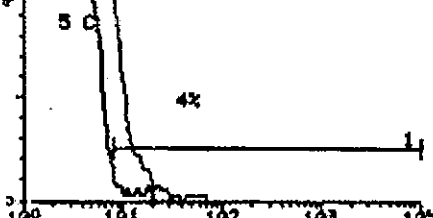
#11:/2/DP200CT011\FL1-H\FL1-Height
3 CONT



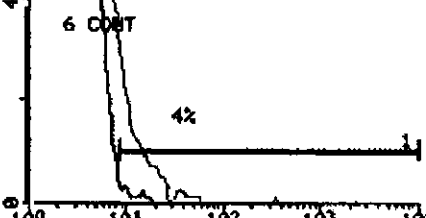
#11:/2/DP200CT015\FL1-H\FL1-Height
4 CONT



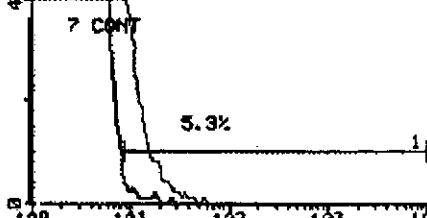
#11:/2/DP200CT018\FL1-H\FL1-Height
5 C



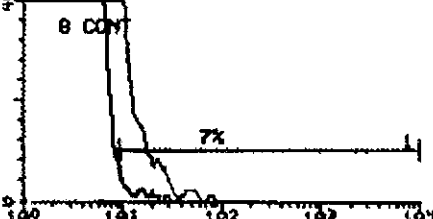
#11:/2/DP200CT021\FL1-H\FL1-Height
6 CONT



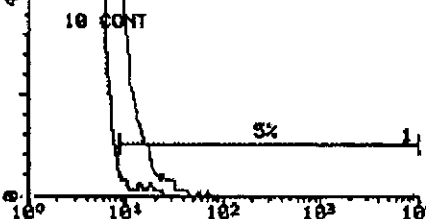
#11:/2/DP200CT024\FL1-H\FL1-Height
7 CONT



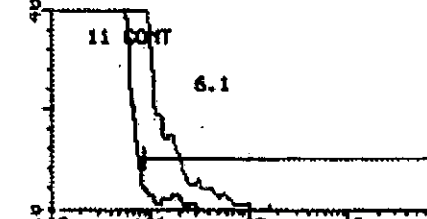
#11:/2/DP200CT028\FL1-H\FL1-Height
8 CONT



#11:/2/DP200CT033\FL1-H\FL1-Height
10 CONT



#11:/2/DP200CT036\FL1-H\FL1-Height
11 CONT



#11:/2/DP200CT039\FL1-H\FL1-Height
12 C

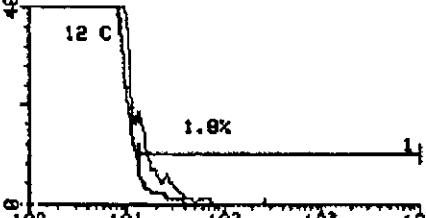
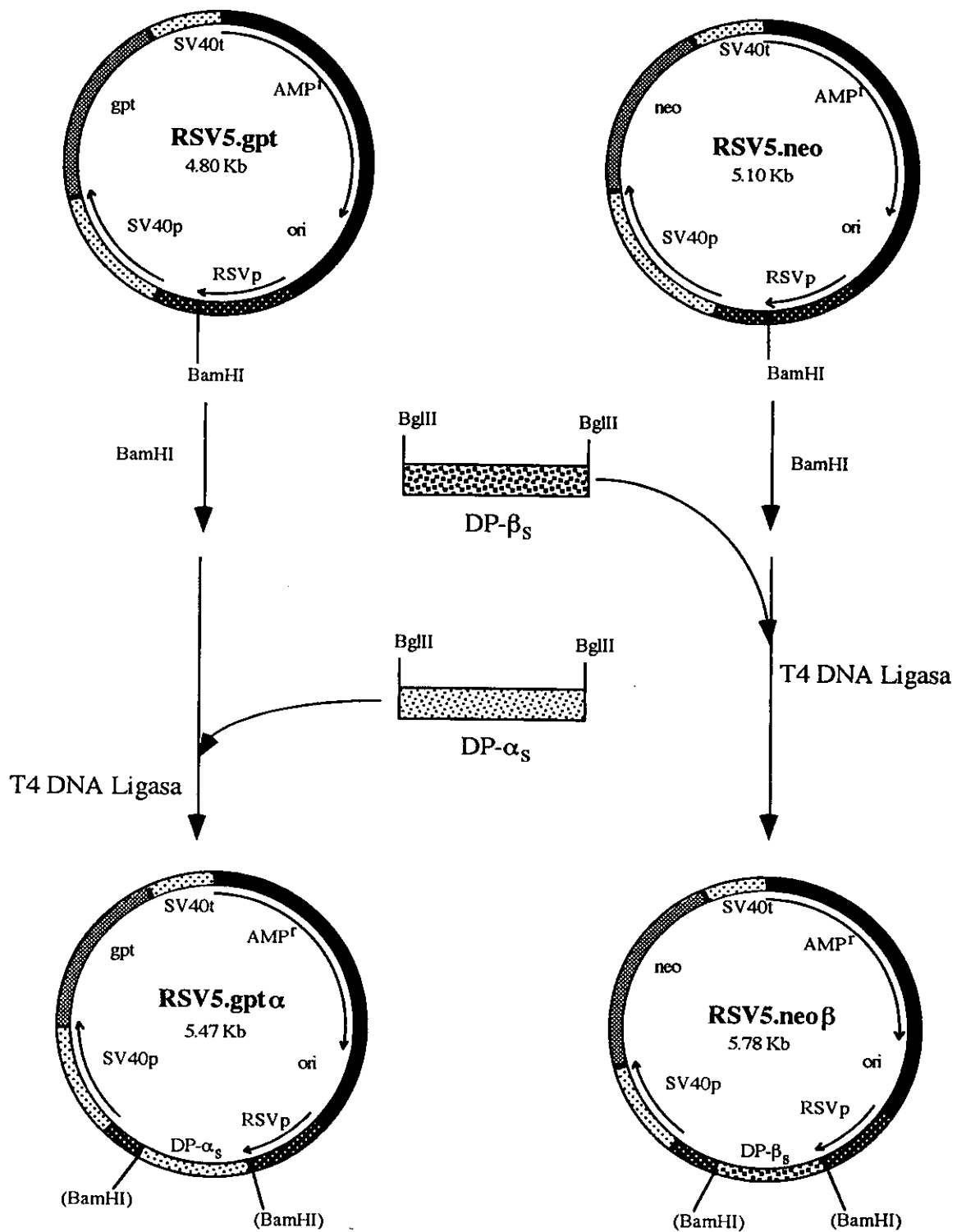


Figura 52. Clonación de las formas solubles de HLA-DP en vectores de expresión para líneas celulares de ratón.



probable de la baja expresión en *S. cerevisiae* podía ser un incorrecto procesamiento de las proteínas. Utilizamos los mismos genes DP α _S y DP β _S que habían sido utilizados en el intento en levadura. Los vectores de expresión en células de ratón para la clonación de los genes DP α _S y DP β _S fueron RSV5.neo y RSV5.gpt; ambos con una diana de clonación BamHI que presentaba extremos cohesivos compatibles con los generados por la enzima BglII, con la que se extraen los genes DP α _S y DP β _S de los plásmidos pUC19-DP α _S y pUC19-DP β _S. El gen DP α _S fue clonado en el vector RSV5.gpt, generándose el vector RSV5.gpt-DP α _S, y el gen DP β _S fue clonado en el vector RSV5.neo, obteniéndose el vector RSV5.neo-DP β _S. Los nuevos vectores se muestran en la figura 52. En este caso, no era posible construir un único vector con una doble cassette de expresión por lo que nos vemos obligados a realizar una cotransfección con ambos vectores.

6.2. Desarrollo de un gen quimérico de HLA-DP.

Una de las estrategias diseñadas fue el desarrollo de un gen quimérico de HLA-DP que codifica DP α _S y DP β _S, unidas por un adaptador sintético, que une el extremo carboxilo de la cadena DP α _S con el extremo amino de la cadena DP β _S. Este tipo de proteínas quiméricas habían sido obtenidas con éxito, en el caso de anticuerpos en los que con un adaptador sintético se habían unido las regiones variables, es lo que se denomina anticuerpos de cadena sencilla (Huston *et al.*, 1991). La pertenencia de las proteínas del Complejo Principal de Histocompatibilidad a la familia de las inmunoglobulinas, a las que pertenecen los anticuerpos, nos llevó a tratar de desarrollar una estrategia similar en el caso de la proteína HLA-DP. Tras el estudio de la bibliografía existente, decidimos elegir como adaptador sintético uno de 15 aa de longitud, compuesto por la triple repetición de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (Johnston *et al.*, 1991). Para lograr la unión de ambas cadenas se recurrió al empleo de la técnica de PCR solapante ("overlapping PCR") (Higuchi, 1990), consistente en la realización de una primera PCR para lograr amplificar por separado ambas cadenas, creando regiones homólogas entre sí, para en una segunda PCR lograr la unión de ambas cadenas, creando el gen quimérico deseado.

6.2.1. Diseño de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos fueron diseñados de tal forma que permitían, en una primera reacción de PCR, generar unas cadenas DP α _S y DP β _S complementarias entre sí, y una de ellas portadora del adaptador sintético (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. De la amplificación anterior para obtener las formas DP α _S y DP β _S se pueden utilizar los oligos ss- α y β -35, ambos dotados de dianas BglII, y además el oligonucleótido β -35 con un triplete de terminación. Los oligonucleótidos diseñados para este experimento fueron:

-Oligonucleótido α -135, diseñado con una homología total en las 27 últimas bases de la región 3' de DP- α , correspondientes al dominio del péptido de conexión.

5' CTCCGTTGTCTCAGGCATCTGGATTGG 3'

-Oligonucleótido β -51, diseñado con homología total en las 24 primeras bases del dominio β -1 del gen DP- β , no siendo necesaria la amplificación de la secuencia señal de dicha cadena; seguido de la secuencia que codifica para el adaptador sintético formada por 45 bases (en

cursiva), y por último en el extremo 5' 22 bases con homología en la región 3' de la cadena DP- α (en negrita):

5'CCAGATGCCTGAGACAACGGAGGGTGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAGGTTCT
GGTGGCGGAGGTTCTAGGGCCACTCCAGAGAATTACC3'

La técnica de la PCR solapante se describe en la figura 53. En primer lugar, se realizó una PCR, por separado para cada cadena amplificando la cadena DP- α con los oligos ss- α y α -135, con los que se logró amplificar las regiones correspondientes a la secuencia señal y los dominios α -1, α -2 y el péptido de conexión; con una diana BglII en la zona 5' del producto amplificado. La cadena DP- β se amplificó con los oligonucleótidos β -51 y β -135; el producto amplificado en esta reacción presentaba un codón de terminación seguido de una diana BglII en la región 3' del producto amplificado mientras que en la región 5' había, por este orden, región homóloga con la zona 3' del amplificado de DP- α , seguido de la secuencia que codificaba para el adaptador sintético formado por la repetición tres veces de la secuencia Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, que hacía de puente de unión entre el extremo carboxilo de la cadena DP- α y el extremo amino de la cadena DP- β , de la que se había eliminado la región que codificaba para la secuencia señal. A continuación, con los productos de ambas PCR se realizó una segunda PCR, en la que dichos amplificados primarios actuaban como molde, usando únicamente los oligonucleótidos de los extremos ss- α y β -135; esto es lo que se llama una PCR solapante, ya que el molde es un resultado del solapamiento de los dos productos obtenidos previamente por separado. El producto resultante de esta segunda reacción de PCR fue un gen quimérico, denominado DP- $\alpha_s\beta_s$, formado por ambas cadenas unidas por un adaptador sintético, con puntos de corte BglII en ambos extremos para facilitar su clonación en los vectores de expresión.

6.2.2. Clonación del gen quimera de HLA-DP en vectores de expresión de *S. cerevisiae* y de líneas celulares de ratón.

El producto de PCR DP- $\alpha_s\beta_s$ se subclonó inicialmente por extremos romos en la diana SmaI del vector pUC19, previo tratamiento con la enzima Klenow para eliminar la extensión de adenosina en 3' y fosforilación con polinucleótido quinasa de los extremos, generándose el plásmido pUC19-DP- $\alpha_s\beta_s$. De éste se extrajo el gen DP- $\alpha_s\beta_s$ digiriendo con BglII y se clonó en la diana homóloga presente en el plásmido YEp352PGK creándose el plásmido pPQ2 (Fig. 54).

Realizamos la clonación en la diana BamHI del vector RSV5.neo el fragmento BglII del plásmido pUC19-DP- $\alpha_s\beta_s$ creándose el vector RSV5.gpt-DP- $\alpha_s\beta_s$ (Fig. 54).

Figura 53. Obtención mediante amplificación con PCR del gen quimera de HLA-DP. Calle 1, DP α soluble; calle 2, DP β soluble; calle 3, gen quimera DP $\alpha\beta$ soluble; calle 4, patrón de tamaños de DNA de pBR328 digerido con BglI y HinfI.

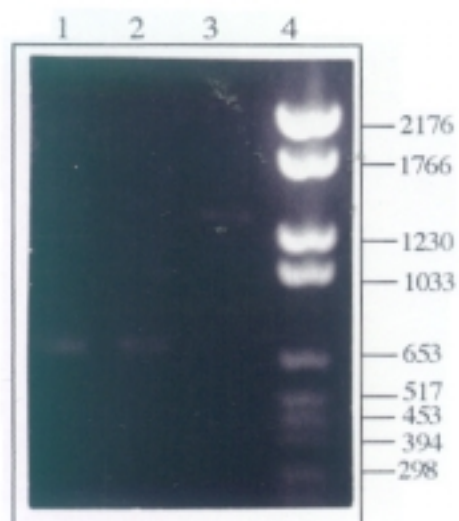
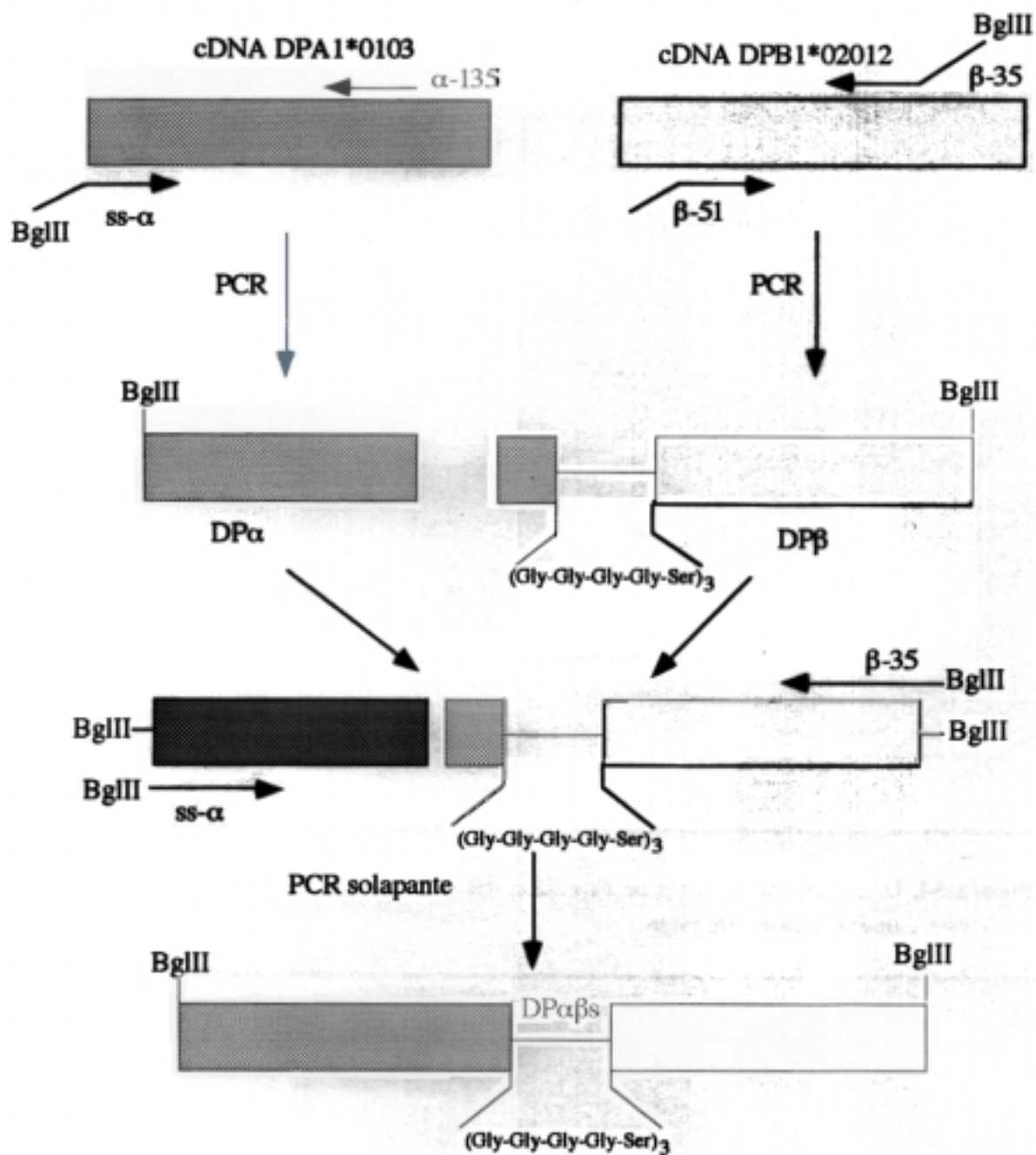
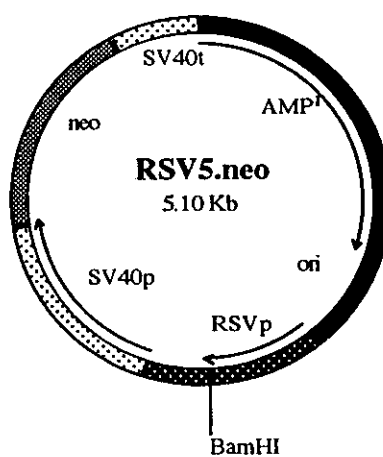
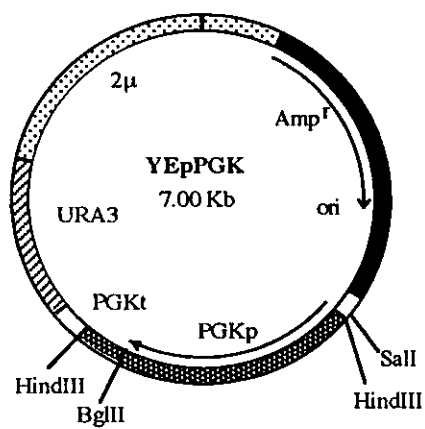


Figura 54. Desarrollo de vectores de expresión del gen quimera de HLA-DP en *S. cerevisiae* y líneas celulares de ratón.



BglII

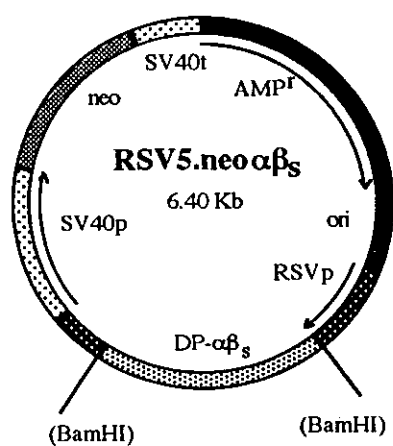
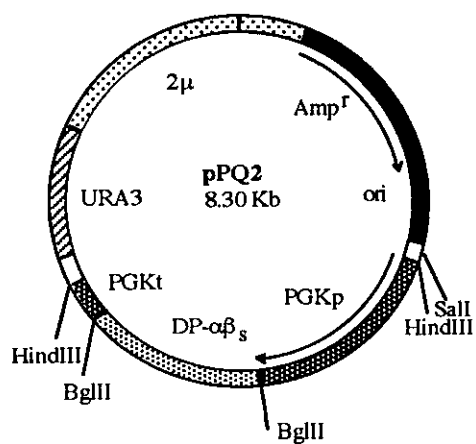
BamHI

BglII

BglII

DP- $\alpha\beta_s$

T4 DNA Ligasa



IV. DISCUSIÓN

En la introducción de esta memoria se ha tratado de hacer una descripción de los diferentes aspectos de la expresión heteróloga de proteínas en levaduras, prestando especial atención a *S. cerevisiae*, con una breve mención acerca de las especies de levadura que alternativamente han irrumpido con fuerza en este campo durante los últimos años paralelamente al desarrollo del conocimiento de su genética.

Entre las estrategias encaminadas a mejorar la expresión heteróloga de proteínas se incluyen las siguientes líneas de trabajo:

- desarrollo de sistemas de alto nivel de expresión, que incluyen el desarrollo de vectores de expresión estables y dotados de fuertes promotores y terminadores eficientes de la transcripción, y el estudio de las modificaciones a las que puede ser sometido un gen heterólogo. Es la línea de trabajo más desarrollada actualmente.

- desarrollo de cepas modificadas, aptas para ser utilizadas como hospedadores para la expresión de genes heterólogos. La mejora de dichas cepas puede ir encaminada a mejorar la eficiencia del proceso de secreción, mediante el empleo de mutantes supersecretorios y/o deficientes en glicosilación, o bien a utilizar mutantes deficientes en proteasas que mejoran la estabilidad de las proteínas producidas.

- mejora de los procesos de recuperación de las proteínas heterólogas de producción intracelular, ya que la presencia de la pared celular de *S. cerevisiae* confiere una elevada resistencia mecánica a la célula.

Dentro de este último apartado se desarrolla nuestro trabajo. Los mutantes autolíticos *slt2* de *S. cerevisiae* son capaces de liberar su contenido intracelular al medio de cultivo por medio de la lisis inducida por un choque térmico del cultivo (de la Fuente *et al.*, 1993); por lo que decidimos estudiar la capacidad de los mutantes para liberar proteínas heterólogas producidas de forma intracelular.

1. LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN MUTANTES AUTOLÍTICOS DE *S. cerevisiae*.

Para abordar el estudio de la liberación de una proteína heteróloga, en primer lugar era necesario elegir una proteína heteróloga modelo para llevar a cabo los estudios. Las características de dicha proteína debían de ser: (i) proteína de producción exclusivamente intracelular, para evitar interferencias en la medida de la cantidad liberada al medio de cultivo como consecuencia de la expresión del fenotipo lítico, (ii) sistema de detección fácil, (iii) alto nivel de producción. La enzima CAT, de origen bacteriano (Shaw 1983), cumplía bien las premisas expuestas anteriormente, con un alto nivel de expresión empleando el plásmido pCH100L, era de producción exclusivamente intracelular (Hadfield *et al.*, 1987) y su detección era posible empleando una reacción colorimétrica (Shaw 1975). Por otro lado, era necesario elegir una cepa autolítica para llevar a cabo los experimentos; los buenos resultados obtenidos en nuestro laboratorio por de la Fuente *et al.* (1993) aconsejaban el uso de la cepa diploide LD1.

Las características de la enzima CAT, expresada en la cepa LD1, se vieron confirmadas tras un primer cultivo discontinuo, realizado en fermentador a 24°C. Únicamente se detectó actividad CAT en los extractos celulares, en niveles crecientes a lo largo de la fase de crecimiento del cultivo, siendo indetectable dicha actividad enzimática en el sobrenadante del medio de cultivo. Esto nos permitió afirmar, que la posterior detección de actividad CAT en el medio de cultivo de un fermentador sometido a un choque térmico a 37°C, tras un crecimiento inicial a 24°C, era debida a la liberación de la enzima al medio extracelular como consecuencia de la lisis que experimentaban las células en esas condiciones. Tras el choque térmico, se alcanzaba la máxima actividad CAT a las 6 h del cambio a 37°C, momento que coincide con la máxima lisis celular y la máxima cantidad de proteínas totales presentes en el medio de cultivo. El aumento de proteínas totales y de actividad CAT en el medio de cultivo se relacionaba con disminuciones de estos parámetros en los extractos celulares. Los resultados anteriores demostraban, por tanto, la capacidad de la cepa LD1 para liberar proteínas heterólogas al medio de cultivo como consecuencia de la expresión del fenotipo lítico. Mediante electroforesis de proteínas se confirmaba que la lisis de estos mutantes, obtenida por medio de un choque térmico libera, proteínas en un amplio rango de pesos moleculares, siendo el patrón de bandas obtenido similar al de un extracto celular.

Sin embargo, tras las 6 h del cambio de temperatura, la actividad CAT en el extracto celular seguía disminuyendo, en el medio extracelular sufría una disminución, terminando por desaparecer. Ya se habían descrito observaciones similares en nuestro laboratorio por de la Fuente *et al.* (1993), que observaron un fenómeno similar en el caso de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, proteína homóloga de *S. cerevisiae*, liberada al medio de cultivo por esta misma cepa, LD1, proponiendo una degradación proteolítica como causa de la desaparición de dicha actividad enzimática. Este hecho, sugería la posibilidad de fenómenos de proteólisis inespecífica por parte de las proteasas de la célula que eran liberadas simultáneamente durante el proceso de lisis celular. Ibba *et al.* (1993) y Pohlig *et al.* (1991) también describen la probable degradación proteolítica de la hirudina secretada por la levadura, cuando cambios en la velocidad de crecimiento de sus cultivos provocaban lisis celular con liberación simultánea de proteasas.

Era bastante probable que debido al carácter extraño para las células, las proteínas heterólogas fueran más susceptibles a la acción de las proteasas, por ello una de las estrategias más lógicas, para reducir este riesgo, era el uso de cepas deficientes en proteasas (Enfors, 1992), ampliamente utilizadas en la expresión de proteínas heterólogas en *S. cerevisiae*.

Dado que la principal causa de proteólisis inespecífica en *S. cerevisiae* son las proteasas de origen vacuolar (Jones, 1991a), los mutantes más adecuados son los deficientes en este tipo de proteasas. Dichas proteasas presentan una ruta de maduración para su activación controlada por la PrA y en menor medida por la PrB. Mutantes *pep4*, afectados en el gen estructural de la PrA, parecen ser los más útiles. No obstante, la observación de Jones (1991a) de que mutantes de este tipo presentan elevados niveles de precursor de la PrB, susceptible de activación por un mecanismo desconocido, aconseja el uso de dobles mutantes *pep4 prb1*. Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, decidimos construir cepas autolíticas (*slt2*) deficientes en proteasas vacuolares, preferentemente un doble mutante *pep4 prb1*.

Debido a la importancia del fondo genético de las cepas en la intensidad de la expresión del fenotipo autolítico, decidimos utilizar dos estrategias: la obtención de cepas por cruce genético, entre cepas autolíticas y cepas deficientes en proteasas, y la interrupción del gen *SLT2* en cepas deficientes en proteasas.

Tras el análisis de las ascosporas generadas en el cruce genético, aislamos tres nuevas cepas líticas deficientes en proteasas: LHDP1, LHDP2 y LHDP3, siendo la cepa LHDP1 un mutante *pep4 prb1*, mientras que las otras dos eran únicamente *pep4*. La cepa LHDP1 era una cepa con una marcada expresión del fenotipo lítico, como lo demuestran los estudios de citometría de flujo y su incapacidad para crecer en medio sólido a 37°C.

La interrupción del gen *SLT2* en la cepa deficiente en proteasas BJ5464 originó la cepa LDKP1, mostrando también un marcado fenotipo lítico a alta temperatura, con un elevado porcentaje de células lisadas medido por citometría de flujo, en comparación con la cepa isogénica silvestre, así como una manifiesta dificultad para crecer en medio sólido a 37°C.

La cepa LHDP1, transformada con el plásmido pCH100L, demostró una mayor estabilidad en las actividades enzimáticas de CAT y fosfatasa alcalina liberadas al sobrenadante de cultivos realizados en fermentador. En el cultivo control, de un fermentador mantenido a 24°C, cabe destacar la mayor producción, tres veces, de CAT en esta cepa en comparación con la cepa LD1 cultivada en idénticas condiciones. Una observación similar ha sido descrita acerca de la expresión de β -galactosidasa en cepas deficientes en proteasas, frente a cepas silvestres, lográndose incrementar el nivel de producción de dicha proteína entre un 18 y 173%, dependiendo de la combinación de mutaciones empleadas (Wingfield y Dickinson, 1993). Estas observaciones podían ser también debidas a la mutación en los genes productores de proteasas de la cepa LHDP1.

En ambas cepas, LD1 y LHDP1, se logra recuperar en el medio de cultivo aproximadamente el 70% de la actividad detectada inicialmente en el interior de las células. Por lo tanto, las mutaciones *pep4* y *prb1* reducen el nivel de proteasas vacuolares, sin afectar a la expresión del fenotipo lítico, contribuyendo a disminuir el riesgo de proteólisis inespecífica y proporcionando mayor estabilidad a la actividad enzimática CAT, producida y liberada al medio de cultivo. No obstante, conviene no olvidar que se trata de una proteína modelo y cada proteína debe de ser estudiada en particular.

Los buenos resultados obtenidos a escala de laboratorio, llevó a plantearnos la posibilidad de estudiar este sistema de liberación en una escala de planta piloto. El crecimiento a alta biomasa de *S. cerevisiae* se ve dificultado por las características de su metabolismo, debido a la existencia del efecto Crabtree en esta especie de levadura. Este efecto impide emplear altas concentraciones de glucosa en el medio, ya que al ser desviada la mayor parte por la ruta fermentativa, la producción de etanol inhibe el crecimiento de las células. Por ello, es necesario emplear sistemas de fermentación alimentada, que mantienen concentraciones de glucosa bajas en el medio de cultivo permitiendo el crecimiento a alta biomasa de *S. cerevisiae* debido al uso del azúcar por vía oxidativa, lo que minimiza la producción de etanol por la vía fermentativa. El sistema elegido era

uno de los más empleados, basado en el control de la alimentación del cultivo en base al cociente respiratorio del mismo (Fieschko *et al.*, 1987), que permite un control en tiempo real del cultivo.

Con estas nuevas condiciones de cultivo, en primer lugar era necesario establecer la capacidad de crecimiento a alta densidad celular de la cepa mutante LD1. Los medios de cultivo elegidos fueron un medio sintético y un medio complejo. La cepa LD1 crecía bien en ambos medios demostrando una buena adaptación al sistema, si bien la velocidad de crecimiento era superior en el medio complejo ($\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$) frente al medio sintético ($\mu = 0.063 \text{ h}^{-1}$). Además la fase de latencia inicial era menor en el medio complejo en comparación con el medio sintético. Teniendo en cuenta la observación previa acerca de la dependencia de la velocidad del crecimiento para lograr una expresión más intensa del fenotipo lítico (de la Fuente, 1991), el elegido fue el medio complejo. Además desde un punto de vista puramente industrial, el cultivo empleando medio sintético completo era desaconsejable, debido a la elevada duración de los cultivos con el incremento de costes que eso supone. Con la cepa transformada con el plásmido pCH100L, se comprobó la estabilidad de dicho plásmido en condiciones de crecimiento a alta biomasa, en ausencia de presión selectiva, y la adaptación fisiológica del plásmido en esas condiciones de crecimiento. La fisiología de *S. cerevisiae* varía en función de las técnicas de cultivo empleadas, pudiendo dar lugar entre otros efectos, a una alta inestabilidad del plásmido y/o a un retraso en la velocidad de crecimiento, debido a la carga adicional para la célula que puede suponer la expresión de una proteína heteróloga (Mason, 1991). El cultivo a 24°C de la cepa LD1/pCH100L en medio complejo demostró tener una tasa de crecimiento de 0.138 h^{-1} , similar a la obtenida para la cepa sin transformar, por lo que la expresión de CAT no afectaba de forma importante al crecimiento de la cepa en esas condiciones. La estabilidad del plásmido, es decir, el número de células portadoras de plásmido sobre el total de células, al final del cultivo con una densidad óptica de 115 y una biomasa de 45 g/l, fue del 43%, lo que se puede considerar aceptable en comparación con el 11% descrito por Fieschko *et al.* (1987) durante el crecimiento de cepas que expresaban interferón. La inestabilidad del plásmido observada por este autor se debía al efecto tóxico de la proteína heteróloga producida. Además, en nuestro caso, se comprobó que hasta densidad óptica de 65, más del 75% de las células son portadoras de plásmido. Esto nos permitía afrontar la realización de cultivos con choque térmico en estas condiciones, con bastantes garantías de detectar actividad CAT en el sobrenadante del medio de cultivo, ya que el choque térmico debe darse en un momento del cultivo en que todavía exista crecimiento activo, entre densidad óptica 30-60, y por tanto con un porcentaje de células portadoras de plásmido aún elevado.

Sin embargo, en los cultivos de la cepa LD1/pCH100L sometidos a choque térmico, no se logró una eficiente expresión del fenotipo lítico. Se observaba una alteración del perfil del cociente respiratorio, lo que producía una parada en el aporte de nutrientes al fermentador. Dicha alteración, del perfil del cociente respiratorio, no se observaba en un fermentador paralelo mantenido todo el tiempo a 24°C, que desarrollaba un crecimiento normal. La alteración del cociente respiratorio probablemente sea debida a un cambio en el comportamiento fisiológico de los mutantes, atribuible bien a la mutación *lyt2*, o bien al fondo genético de la cepa. No obstante, este resultado negativo no descarta el uso de estos mutantes a escala industrial, sino más bien indica la necesidad de evaluar otros sistemas para lograr la lisis controlada del cultivo, o el uso de otros sistemas para controlar la alimentación del fermentador, que permitan la expresión del

fenotipo lítico; por ejemplo, empleando el sistema desarrollado por Porro *et al.* (1991), basado en los cambios de pH que experimenta el cultivo como resultado de las diferentes situaciones metabólicas de las células. Otra forma posible de lograr una lisis controlada es el choque osmótico de las células, que se discute en el siguiente apartado.

2. LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS POR CHOQUE OSMÓTICO.

Decidimos desarrollar sistemas alternativos para lograr la lisis de los mutantes *slt2*. Para ello, basándonos en la capacidad de crecimiento de las cepas autolíticas a 37°C en presencia de un estabilizador osmótico, sorbitol 1 M, estudiamos el efecto en el cultivo de la retirada de la estabilización osmótica, en células crecidas en esas condiciones. Tras la resuspensión de las células de las cepas LD1, LHDP1 y LDKP1 en medio hipoosmótico, se produce una lisis masiva, en torno al 80% de las células, de forma instantánea.

Este choque osmótico conduce a una liberación de proteínas al medio extracelular, similar cualitativamente a la lograda con choque térmico, como se demuestra mediante electroforesis de proteínas. Además, la valoración de la actividad CAT liberada en el sobrenadante, tras un choque osmótico de cepas transformadas con el plásmido pCH100L, permite concluir que aproximadamente el 70% de la actividad inicial, detectada en las células antes del choque osmótico, es recuperada en el sobrenadante de cultivo; este dato es similar a la cantidad de proteína que se recuperaba con el choque térmico. Nuevamente se corrobora la mayor producción de CAT en las cepas LHDP1 y LDKP1, deficientes en proteasas, en comparación con la cepa LD1.

Frente a la obtención de preparaciones crudas de proteínas por choque térmico, que requerían al menos 4-8 h para lograrlas, el empleo del choque osmótico presenta la enorme ventaja de su rapidez en la obtención de las preparaciones de proteínas, debido a la lisis celular inmediata que se produce, con el ahorro de tiempo que eso supone sin olvidar la menor exposición de la proteína a fenómenos degradativos para ella. Sin embargo, la principal desventaja del sistema es el elevado coste del sorbitol, que se emplea a concentración 1 M. Para resolver este problema hemos realizado estudios acerca de la mínima cantidad de sorbitol necesaria para permitir el crecimiento de las cepas, de modo que cantidades en torno a 0.5 M parecen ser adecuadas para este propósito; asimismo se han evaluado otros estabilizadores osmóticos, más económicos, de tipo salino (NaCl 1.5%) con resultados preliminares aceptables.

La purificación de una proteína a partir de muestras procedentes de choque térmico, requiere inicialmente el empleo de técnicas para reducir el volumen de la muestra, debido a la baja concentración inicial de proteína presente en el sobrenadante del cultivo. Para lograr la concentración de CAT se utilizaron dos técnicas: mediante ultrafiltración, se consiguió reducir el volumen 15 veces con una buena recuperación de la actividad. La precipitación con sulfato amónico, aunque permitía obtener un cierto grado de purificación inicial, que representa una ventaja respecto de la ultrafiltración, la recuperación era sólo del 65%. Otra ventaja del choque osmótico es la posibilidad de resuspender las células en un volumen inferior al de partida, entre un 1/5 y 1/10 del volumen inicial de cultivo, sin disminuir el porcentaje de la lisis y manteniendo

la liberación de proteínas al medio extracelular. Esto permite la obtención de preparaciones crudas de proteínas más concentradas, que serán más útiles para posteriores procesos de purificación de la proteína de interés.

Por otra parte, la liberación de proteínas particuladas, como VLP, a partir de mutantes *slt2* por medio de un choque osmótico, indica la versatilidad del sistema, ya que muestra la posibilidad de liberar proteínas en un amplio rango de pesos moleculares: desde los 25 kD del CAT hasta los 12000 kD de una partícula VLP formada por 300 subunidades de la proteína p1 (Kingsman *et al.*, 1991). El elevado tamaño de estas partículas, 60 nm, requiere su producción de forma intracelular. La gran variedad de proteínas que pueden ser fusionadas a la proteína p1 permitiendo la creación de partículas híbridas (Kingsman *et al.*, 1991), así como la posibilidad de liberarlas de una forma sencilla por medio de un choque osmótico usando estos mutantes, crea un sistema de grandes posibilidades, permitiendo afrontar la purificación de estas proteínas de una forma rápida eliminando la rotura mecánica de las células.

3. COMPARACIÓN DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS INTRACELULARES CON OTROS SISTEMAS DE LIBERACIÓN.

Se han descrito varios sistemas para lograr la liberación de proteínas heterólogas producidas intracelularmente: sistemas basados en otro tipo de mutantes líticos, uso de complejos enzimáticos líticos, métodos químicos y los tradicionales sistemas físicos de rotura celular. A continuación, discutimos estos sistemas en comparación con el sistema basado en el choque osmótico desarrollado en nuestro laboratorio.

Frente a un sistema similar de liberación de proteínas, recientemente publicado, basado en el empleo de mutantes líticos *srbl* (Bröker 1994), nuestro sistema presenta una eficiencia mayor. La lisis sufrida por los mutantes *srbl* tras el choque osmótico únicamente alcanza al 20% de la población celular, frente al 80% de células lisadas en nuestro sistema. Esto implica que la recuperación de la proteína sea mayor, con un 70%, frente al 20% recuperado con el mutante *srbl*. Aparte de estas claras ventajas, existen otros factores menores que hacen más manejable el sistema basado en mutantes *slt2*. Las cepas *srbl* requieren la presencia de un estabilizador osmótico a cualquier temperatura para mantener su viabilidad, lo que complica su manipulación en el laboratorio, su cultivo y conservación. Esto es innecesario en el manejo de cepas *slt2*, que a la temperatura de 24°C, se comportan como una cepa silvestre.

El sistema de liberación diferencial de productos (DPR), descrito por Huang *et al.* (1991), requiere el uso de unas enzimas líticas de otros organismos que deben ser previamente producidas, obtenidas y purificadas, lo que eleva el coste del proceso, siendo importante la purificación; ya que empleando los complejos enzimáticos sin purificar se observó, por ejemplo, degradación proteolítica de las proteínas VLP liberadas por este método (Asenjo *et al.*, 1993). El proceso DPR se basa en la digestión de la pared celular con dichas enzimas generando protoplastos que más tarde serán lisados por medio de un choque osmótico, de aquí parte otro problema pues las enzimas líticas se mezclan con el producto liberado pudiendo interferir (i) con dicho producto degradándolo, como se mencionó anteriormente, (ii) con posteriores procesos de purificación

específicos de la proteína heteróloga que se está produciendo. Sin embargo, una de las ventajas del sistema es su posible aplicación a cualquier cepa de *S. cerevisiae*, tanto de laboratorio como industrial.

Examinando los sistemas basados en el uso de detergentes y solventes químicos para acelerar los procesos de autólisis, mediante inducción de plasmolisis de las células (Breddam y Beenfeldt, 1991), nuestro sistema presenta ventajas. En primer lugar, el empleo de autólisis inducida por solventes y detergentes requiere largos tiempos de incubación para lograr la liberación del contenido intracelular, entre 25-40 horas, dependiendo del compuesto químico ensayado y de la cepa, lo que supone un elevado riesgo de proteólisis para los productos liberados, por el elevado tiempo que están en contacto con las proteasas que son liberadas simultáneamente. Además la adición de detergentes y solventes químicos puede inducir la desnaturalización de algunas de las proteínas liberadas e interferir con los posteriores procesos de purificación, ya que algunos de estos compuestos son difíciles de eliminar en un proceso de purificación, sin aplicar técnicas dañinas para las proteínas. Su principal ventaja vuelve a ser su aplicación a cualquier cepa tanto industrial como de laboratorio.

En comparación con los diferentes sistemas de rotura mecánica, especialmente con los homogeneizadores y las bolas de vidrio, aunque la recuperación en nuestro sistema es el 70% de la proteína frente a la que puede ser obtenida por estos métodos, presenta la ventaja de generar unos restos celulares compactos fácilmente separables por centrifugación, a diferencia de los sistemas de rotura mecánica.

Así pues, el sistema de liberación de proteínas heterólogas intracelulares basado en el uso de mutantes *slt2* por choque osmótico presenta una serie de ventajas que le acercan a algunas de las características del sistema ideal propuesto por Foster, (1992):

- el tiempo de residencia es bajo ya que la lisis se puede lograr de forma inmediata, disminuyendo riesgos de degradaciones inespecíficas.

- no tiene los problemas de generación de calor que presentan los sistemas de rotura físicos, que requieren el uso de sistemas de refrigeración muy potentes, y limita su uso en el caso de proteínas termolábiles.

- es un sistema de bajo coste ya que no requiere el uso de aparatos especialmente diseñados para tal fin, por lo que el mantenimiento y consumo de energía son bajos.

- en un principio no se intuyen desventajas para ningún tipo de proteínas a diferencia de otros sistemas.

- susceptible de escalado sin necesidad de un desarrollo en equipamiento complicado.

- la recuperación de producto es buena, con un 70% sobre lo que se puede obtener por medio de una rotura mecánica. No obstante cada proteína heteróloga tiene sus propias características y su comportamiento en este sistema de liberación debe ser estudiado individualmente.

Las buenas perspectivas del sistema nos llevaron a solicitar la patente del proceso, tanto del choque térmico como del choque osmótico (Álvarez *et al.*, 1994b) que se encuentra en fase de estudio, al mismo tiempo que los resultados fueron objeto de publicación (Álvarez *et al.*, 1994a).

4. AMPLIACIÓN DEL SISTEMA DE LIBERACIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS BASADO EN EL EMPLEO DE MUTANTES AUTOLÍTICOS A OTRAS ESPECIES DE LEVADURA.

Como se ha descrito anteriormente, en la introducción de esta memoria, *P. pastoris* ha sido desarrollada como especie alternativa en la expresión de proteínas heterólogas (Cregg *et al.*, 1993).

El éxito en el desarrollo de un sistema de liberación de proteínas heterólogas intracelulares basado en la lisis controlada que se puede lograr empleando mutantes *slt2*, nos ha llevado a tratar de ampliar el sistema a otras levaduras alternativas comenzando por *P. pastoris*. Ambas especies son ascomicetos, con una pared celular similar, principalmente compuesta por manano y glucano. Esta semejanza, junto a la conservación demostrada de las MAP quinasas, incluso en sistemas celulares muy separados en la escala filogenética, indica la probable presencia de una ruta de transmisión de señales que controle el mantenimiento de la integridad celular en *P. pastoris*, en la que intervenga una proteína homóloga de Slt2p de *S. cerevisiae*. De hecho, en nuestro laboratorio se ha obtenido el gen *MKC1* de *C. albicans* (Navarro *et al.*, 1995), homólogo del gen *SLT2* de *S. cerevisiae*. La funcionalidad cruzada de genes entre ambas especies de levaduras permite abordar la clonación por complementación de un mutante *slt2* de *S. cerevisiae* (Cregg *et al.*, 1985).

Mediante una hibridación DNA-DNA, utilizando como sonda un fragmento del gen *SLT2*, correspondiente a la zona de los dominios más conservados, frente al genoma de *P. pastoris*, se confirmó la posible presencia de un gen homólogo en dicha especie. En el carril de DNA genómico de *C. albicans* se detectó una banda con el tamaño esperado para el gen *MKC1*, y con una intensidad similar a las bandas que aparecen en los carriles del DNA genómico de *P. pastoris* cortado con diferentes enzimas de restricción.

La disponibilidad en nuestro laboratorio de una genoteca genómica de *P. pastoris* en un vector bacteriano, nos llevó a tratar de desarrollar una sonda del gen homólogo mediante PCR. La secuenciación de los fragmentos amplificados a partir del DNA genómico de *P. pastoris* con oligonucleótidos degenerados correspondientes a zonas conservadas de MAP quinasas, demostró que de forma reiterada se amplificaban fragmentos con mayor homología frente a Fus3p y Kss1p, MAP quinasas de la ruta de transmisión de señales relacionada con los procesos de apareamiento de *S. cerevisiae*. En un caso, se obtuvo un fragmento homólogo a *CDC28*, que codifica una quinasa encargada de la regulación del ciclo mitótico (Lorincz y Reed, 1984), pero no se logró ningún clon con homología mayoritaria por la proteína Slt2p. Esto no descarta la presencia de un homólogo de esta proteína, ya que el problema puede ser debido a las características de los oligonucleótidos utilizados. Se descartó el diseño de nuevos oligonucleótidos, que incluyeran zonas más específicas de *SLT2*, al disponer de una genoteca genómica de *P. pastoris* en un vector de *S. cerevisiae* (cedida por el Dr. William Payne, MIT, USA), que permite la clonación de homólogos funcionales mediante complementación fenotípica de un mutante *slt2* de *S. cerevisiae*. Estos trabajos se están realizando en la actualidad.

5. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HLA-DP DE CLASE II EN *S. cerevisiae*.

La expresión de la proteína HLA-DP de clase II se abordó mediante la obtención de formas solubles de ambas cadenas, creando unos genes truncados en los que se han eliminado los dominios transmembrana y citoplásmicos. Mientras se realizaban estas construcciones se publicó la expresión con éxito de la proteína HLA-DR clase II en baculovirus, empleando una estrategia similar (Stern y Wiley, 1992).

En el diseño de los oligonucleótidos para llevar a cabo las reacciones de amplificación por PCR decidimos mantener la secuencia señal de las cadenas α y β , apoyados en ejemplos descritos del uso de secuencias señal de mamíferos que funcionaron eficazmente en la secreción de sus proteínas en *S. cerevisiae*, como en el caso del α -interferón (Hitzeman *et al.*, 1983), de la α -amilasa de ratón (Thomsen, 1983), de la lisozima humana (Jigami *et al.*, 1986) y de pollo (Oberto y Davinson, 1985) e inmunoglobulinas de ratón (Wood *et al.*, 1985).

El diseño del vector de expresión pPQ1 fue laborioso, requiriendo varias subclonaciones intermedias. Dicho vector consta de ambas cadenas bajo dos promotores de genes de la ruta glicolítica, *PGK* y *ADC1*. Un experimento de "Northern blot" demostró el correcto funcionamiento de ambas cassettes de expresión detectándose cantidades similares de las dos cadenas, lo que hace suponer la existencia de aproximadamente igual número de moléculas de mRNA.

La detección de la proteína requería la presencia del heterodímero con la conformación estructural específica, ya que los anticuerpos monoclonales disponibles sólo reconocían epítomos que se formaban cuando dichas cadenas adoptan la conformación correcta, no existiendo anticuerpos capaces de reconocer ambas cadenas por separado. Decidimos realizar un marcaje intracitoplasmático de los heterodímeros de HLA-DP soluble en tránsito en el interior de las células de *S. cerevisiae* por citometría de flujo. Los resultados de ese marcaje intracitoplasmático indicaron un bajo nivel de formación de heterodímeros, detectándose únicamente subpoblaciones en torno al 4-10% de la población total con una señal de emisión de fluorescencia significativa. No se ha podido cuantificar la expresión de los polipéptidos por separado debido a que no existen anticuerpos capaces de reconocer epítomos presentes en las cadenas aisladas.

Las causas que pueden explicar el bajo nivel de expresión de los heterodímeros α - β son variadas: (i) un ineficaz funcionamiento de la secuencia señal también podría ser responsable de la falta de expresión del heterodímero. Tampoco debemos olvidar que una vez translocada la proteína al interior del retículo endoplásmico entran en juego además otros factores como la naturaleza de la proteína para que tenga lugar un correcto ensamblaje y secreción de la misma. (ii) El carácter glicoproteico de ambos polipéptidos puede provocar una hiperglicosilación de los mismos en *S. cerevisiae*. Este hecho, además de poder interferir con su estructura, puede bloquear el acceso de los anticuerpos a sus epítomos (Ruohonen *et al.*, 1987 y Romanos *et al.*, 1992). Por lo tanto existen diferentes causas posibles que pueden estar interfiriendo con el reconocimiento del anticuerpo.

El elevado número de factores explicativos del fallo en la expresión heteróloga de estos genes, nos ha llevado a plantear su expresión en un sistema celular de mamíferos. En este sistema, líneas celulares de ratón, el procesado post-traducciona l de esta proteína debe ser realizado con mayor eficacia por la maquinaria celular.

Recientemente, hemos iniciado otra aproximación basada en la construcción de un gen quimera que codifica para una proteína formada por ambas cadenas α y β unidas por medio de un adaptador sintético. Esta idea se basa en el desarrollo de anticuerpos de cadena sencilla (Huston *et al.*, 1991 y Johnson y Bird, 1991). Por medio de esta aproximación podemos facilitar el plegamiento y ensamblaje de la proteína. Este tipo de adaptador ha demostrado no interferir en el plegamiento de los dominios de los anticuerpos producidos. La secuencia del adaptador debe ser de carácter hidrofílico para permitir un correcto plegamiento de la proteína, por lo que está formado por la repetición triple del pentámero (Gly)₄-Ser. El residuo de serina contribuye a incrementar el carácter hidrofílico y los residuos de glicina incrementan el número de posibles conformaciones, reduciendo al mínimo el impedimento estérico entre las posibles interacciones nativas entre los diferentes dominios (Huston *et al.*, 1991). Para construir este gen quimera se utilizó la técnica denominada "PCR solapante" (Higuchi, 1990), empleando dos reacciones de PCR secuencialmente, obteniéndose en la primera dos productos de PCR con homología entre ellos, que son utilizados como moldes en una segunda reacción de PCR.

El gen quimera obtenido de esta forma ha sido clonado tanto en vectores de expresión de *S. cerevisiae* como en los específicos para células de ratón, con el objeto de estudiar comparativamente su expresión en ambos sistemas celulares.

V. CONCLUSIONES

1. El empleo de cepas *slt2* de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en el mantenimiento de la integridad celular, permite el desarrollo de un sistema de liberación al medio de cultivo de proteínas heterólogas producidas intracelularmente, mediante la expresión del fenotipo lítico de los mutantes *slt2*.

2. La expresión del fenotipo lítico se puede lograr mediante un choque térmico a 37°C en un cultivo crecido previamente a 24°C. Siguiendo este método se ha logrado la liberación de la proteína de 25 kD, CAT, de origen bacteriano al medio de cultivo. La lisis alcanza al 80% de las células, y la proteína CAT liberada y recuperada en el medio de cultivo correspondía al 70% de la proteína detectada inicialmente en el interior de las células.

3. Otro método para lograr la liberación de proteínas es el choque osmótico. Se basa en la sensibilidad osmótica de las células *slt2* cuando crecen a 37°C en presencia de un estabilizador osmótico. La transferencia de células crecidas en esas condiciones a un medio sin estabilización osmótica provoca la lisis inmediata del 80-90% del cultivo. La cantidad de proteína CAT liberada y recuperada en el sobrenadante del cultivo es del 70%, respecto de la presente en el interior de las células.

4. La capacidad de los mutantes para liberar proteínas particuladas (VLPs) al medio de cultivo tras expresión del fenotipo lítico indica la versatilidad del sistema respecto del tipo de proteína que puede ser liberada.

5. El empleo de cepas líticas deficientes en proteasas (*pep4 prb1*) aumenta la producción intracelular y la estabilidad de la proteína CAT liberada al medio de cultivo.

6. Una hibridación de DNA heteróloga demuestra la posible presencia de fragmentos de DNA en el genoma de *P. pastoris* con homología con el gen *SLT2* de *S. cerevisiae*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Achstetter, T. and Wolf, D.H. 1985. Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *S. cerevisiae*. *Yeast* 1: 139-157.
- Adams, S.E., Dawson, K.M., Gull, K., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. 1987. The expression of hybrid Ty virus-like particles in yeast. *Nature* 329: 68-70.
- Alvarez, P., Sampedro, M., Molina, M. and Nombela, C. 1994a. A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *J. Biotechnology* 38: 81-88.
- Alvarez, P., Fuente, J.M. de la, Molina, M. and Nombela, C. 1994b. Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *S. cerevisiae*. P 9401536.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354.
- Ammerer, G., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., Valls, L.A. and Stevens, T.H. 1986. *PEP4* gene of *S. cerevisiae* encodes the proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell Biol.* 6: 2490-2493.
- Arima, K., Oshima, T., Kubota, I., Nakamura, N., Mizunaga, T. and Toh-e, A. 1983. The nucleotide sequence of the yeast *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide. *Nucleic Acids Res.* 11: 1657-1672.
- Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant protein particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. *Bio/Technology* 11: 214-217.
- Avery, L. and Wasserman, S. 1992. Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies. *TIG* 8: 312-316.
- Ballou, C.E. 1970. A study of the immunogenicity of three yeast mannans. *J. Biol. Chem.* 245: 1197-1203.
- Barr, K.A., Hopkins, S.A. and Sreekrishna, K. 1992. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* 12: 48-51.
- Barr, P.J., Gibson, H.L., Enea, V., Arnot, D.E., Hollingdale, M.R. and Nussenzweig, V. 1987a. Expression in yeast of a *Plasmodium vivax* antigen of potencial use in a human malaria vaccine. *J. Experimental Medicine* 165: 1160-1171.
- Barr, P.J., Steimer, K.S., Sabin, E.A., Parkes, D., George-Nascimento, C., Stephans, J.C., Powers, M.A., Gyenes, A., Van Nest, G.A., Miller, E.T., Higgins, K.W. and Luciw, P.A. 1987b. Antigenicity and immunogenicity of domains of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope protein expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vaccine* 5: 90-101.
- Barr, P.J., Cousens, L.S., Lee-Ng, C.T., Medina-Selby, A., Masiarz, F.R., Hallewell, R.A., Chamberlain, S.H., Bradley, J.D., Lee, D., Steimer, K.S., Poulter, L., Burlingame, A.L., Esch, F. and Baird A. 1988. Expression and processing of biologically active fibroblast growth factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263: 16471-16478.
- Beesley, K.M., Francis, M.J., Clarke, B.E., Beesley, J.E., Dopping-Hepenstal, P.J.C., Clare, J.J., Brown, F. and Romanos, M.A. 1990. Expression in yeast of amino-terminal peptide fusions to hepatitis B core antigen and their immunological properties. *Bio/Technology* 8: 644-649.
- Beggs, J.D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* 275: 104-109.
- Beggs, J.D., van den Berg, J., Van Ooyen, A. and Weissman, C. 1980. Abnormal expression of chromosomal rabbit b-globin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 283: 835-840.
- Benacerraf, B. 1991. Role of MHC gene products in immune regulation. *Science* 212: 1229.
- Bevan, E.A. and Costello, W.P. 1964. The preparation and use of an enzyme which breaks open yeast asci. *Microbiol. Genet. Bull.* 21: 5.

- Bitter, G.A. and Egan, K.M. 1988. Expression of interferon-gamma from hybrid yeast *GPD* promoters containing upstream regulatory sequences from the *GAL1-GAL10* intergenic region. *Gene* 69: 193-207.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mullenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P. and Barr, P.J. 1984. a-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642-4646.
- Brake, A.J. 1989. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast a-factor leader. In Barr, P.J., Brake, A.J. and Valenzuela, P. (Eds.), *Yeast Genetic Engineering*, Butterworths, 269-280.
- Breddam, K. and Beenfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 323-329.
- Bröker, M. 1994. Isolation of recombinant proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by use of osmotically fragile mutant strains. *BioTechniques* 16: 604-610.
- Cabib, E. and Duran, A. 1975. Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at non-permissive temperatures. *J. Bacteriol.* 124: 1604-1606.
- Campbell, J.L. 1983. Yeast DNA replication. In Setlow, J.K. and Hollaender, A. (Eds.), *Genetic Engineering Principles and Methods*, Vol. 5 Plenum, New York, 109-146.
- Cantrell, M.A., Anderson, D., Cerretti, D.P., Price, V., McKereghan, K., Tushinski, R.J., Mochizuki, D.Y., Larsen, A., Grabstein, K., Gillis, S. and Cosman, D. 1985. Cloning, sequence and expression of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6250-6254.
- Cigan, A.M. and Donahue, T.F. 1987. Sequence and structural features associated with translational initiator regions in yeast-a review. *Gene* 59: 1-18.
- Clancy, S., Mann, C., Davis, R.W. and Calos, M.P. 1984. Deletion of plasmid sequences during *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *J. Bacteriol.* 159: 1065-1067.
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A. 1991a. High-level expression of tetanus toxin fragment c in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* 9: 455-460.
- Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. and Henwood, C.A. 1991b. Production of epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105: 205-212.
- Clark, J.M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9688.
- Clarke, L. and Carbon, J. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature* 257: 504-509.
- Clements, J.M., Catlin, G.H., Price, M.J. and Edwards R.M. 1991. Secretion of human epidermal growth factor from *Saccharomyces cerevisiae* using synthetic leader sequences. *Gene* 106: 267-272.
- Cousens, D.J., Wilson, M.J. and Hinchcliffe, E. 1990. Construction of a regulated PGK expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18: 1308.
- Cousens, L.S., Shuster, J.R., Gallegos, C., Ku, L., Stempien, M.M., Urdea, M.S., Sanchez-Pescador, R., Taylor, A. and Tekamp-Olson, P. 1987. High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 61: 265-275.
- Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. and Madden, K.R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell Biol.* 5: 3376-3385.
- Cregg, J.M. 1987. In proceedings of the Fifth International Symposium on Microbial Growth on C1 Compounds (Van Verseveld, H.W. and Duine, J.A., eds.), Nijhoff, Dordrecht.

- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11: 905-910.
- Crueger, W. 1989. *Biotechnology. A textbook of Industrial Microbiology*. 2n Ed. Brock, T. (Ed.), Sinauer Associates, Sunderland MA-USA.
- Davenport, K., Sohaskey, M. and Gustin, M.C. 1994. Hypotonic shock increases tyrosine phosphorylation of Slp18p/Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. 1994 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, Seattle, USA. Abstract 114B.
- Davis, L.G., Digner, M.D. and Battey, J.F. 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier Science Publishing Co., New York.
- De Baetselier, A., Vasavada, A., Dohet, P., Ha-Thi, V., De Beukelaer, M., Erpicum, T., De Clerk, L., Hanotier, J. and Rosenberg, S. 1991. Fermentation of a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: Scale-up, purification and characterisation of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* 9: 559-561.
- Diaz, M., Sanchez, Y., Bennett, T., Sun, C.R., Godoy, C., Tamanoi, F., Duran, A. and Perez, P. 1993. The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2+* gene codes for the b subunit of a geranylgeranyltransferase type I required for b-glucan synthesis. *EMBO J.* 12: 5245-5254.
- Digan, M.E., Lair, S.V., Brierley, R.A., Siegel, R.S., Williams, M.E., Ellis, S.B., Kellaris, P.A., Provow, S.A., Craig, W.S., Velicelebi, G., Harpold, M.M. and Thill, G.P. 1989. Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 7: 160-164.
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. and Gingeras, T.R. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1111-1121.
- Emanuel, J.R. 1991. Simple and efficient system for synthesis of non-radioactive nucleic acid hybridization probes using PCR. *Nucleic Acids Res.* 19: 2790.
- Enfors, S.O. 1992. Control of *in vivo* proteolysis in the production of recombinant proteins. *TIBTECH* 10: 310-315.
- Ernst, J.F. 1988. Codon usage and gene expression. *TIBTECH* 6: 196-199.
- Errede, B. and Levin, D.E. 1993. A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 254-260.
- Fieschko, J.C., Egan, K.M., Ritch, T., Koski, R.A., Jones, M., and Bitter, G.A. 1987. Controlled expression and purification of human immune interferon from high-cell-density fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 113-121.
- Fink, G.R. 1971. *Methods in Enzymology*, vol. XVIII, Academic Press, New York, London.
- Fleer, R. 1992. Engineering yeast for high level expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 486-496.
- Fogel, S. and Welch, J.W. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5342-5346.
- Foster, D. 1992. Cell disruption: breaking up is hard to do. *Bio/Technology* 10: 1539-1541.
- Fuente, J.M. de la. 1991. Caracterización de enzimas y mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* relacionados con funciones de autólisis de la pared celular. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Fuente, J.M. de la, Alvarez, A., Nombela, C. and Sánchez, M. 1992. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* 8: 39-45.
- Fuente, J.M. de la, Vázquez, A., González, M., Sánchez, M., Molina, M. and Nombela, C. 1993. Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 763-769.
- Garret, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. 1989. Specificity pockets for the sidechains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342: 692-696.

- Gellissen, G., Melber, K., Janowicz, Z.A., Dahlems, U.M., Weydemann, U., Piontek, M., Strasser, A.W.M. and Hollenberg, C.P. 1992. Heterologous protein production in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 62: 79-93.
- Gill, G.S., Zaworski, P.G., Marotti, K.R. and Rehberg, E.F. 1990. A novel screening system for yeast strains capable of secreting tissue plasminogen activator. *Bio/Technology* 8: 956-958.
- Gleeson, M. and Sudbery, P.E. 1988. The methylotrophic yeasts. *Yeast* 4: 1-15.
- Gleeson, M. and Howard, B.D. 1991 Genes which influence *Pichia* proteolytic activity and uses. Patent application 50848.
- Griffiths, J.C., Berrie, E.L., Holdsworth, L. N., Moore, J.P., Harris, S.J., Senior, J.M., Kingsman, S.M., Kingsman, A.J. and Adams, S.E. 1991. Induction of high-titer neutralizing antibodies, using hybrid human immunodeficiency virus V3-Ty viruslike particles in a clinically relevant adjuvant. *J. Virol.* 65: 450-456.
- Gritz, L. and Davies, J. 1983. Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25: 179-188.
- Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 45: 149-158.
- Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1987. Sequence and expression characteristics of a shuttle chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 52: 59-70.
- Hagenson, M.J., Holden, K.A., Parker, K.A., Wood, P.J., Cruze, J.A., Fuke, M., Hopkins, T.R. and Stroman, D.W. 1989. Expression of streptokinase in *Pichia pastoris* yeast. *Enzyme Microbiol. Technol.* 11: 650-656.
- Hallewell, R.A., Mills, R., Tekamp-Olson, P., Blacher, R., Rosenberg, S., Otting, F., Masiarz, F.R. and Scandella, C.J. 1987. Amino terminal acetylation of authentic human Cu, Zn superoxide dismutase produced in yeast. *Bio/Technology* 5: 363-366.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover, D.M.(Eds.) *DNA cloning*. IRL Press, Oxford, England, 120.
- Henderson, R.C.A., Cox, B.S. and Tubb, R. 1985. The transformation of brewing yeasts with a plasmid containing the gene for copper resistance. *Curr. Genet.* 9: 133-138.
- Higuchi, R. 1990. In: PCR protocols. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and Whitepp, T.J., (Eds.), Academic Press, San Diego, California, 177.
- Hill, J., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A. 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2: 163-167.
- Hill, J., Donald, K.A.I.G. and Griffiths, D.E. 1991. DMSO-enhanced whole-cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res.* 19: 5791.
- Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933.
- Hinnen, A., Meyhack, B. and Heim, J. 1989. Heterologous gene expression in yeast. In Barr, P.J., Brake, A.J. and Valenzuela, P. (Eds.), *Yeast Genetic Engineering*, Butterworths, 193-213.
- Hirsch, H.H., Rendueles, P.S. and Wolf, D.H. 1989. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) proteinases: structure, characteristics and function. In Walton, E.F. and Yarranton, G.T. (Eds.), *Molecular and Cell Biology of Yeasts*. Blackie and Van Nostrand Reinhold, 134-200.
- Hitzeman, R.A., Hagie, F.F., Levine, H.L., Goeddel, D.W., Ammerer, G. and Hall, B.D. 1981. Expression of human gene for interferon in yeast. *Nature* 293: 717-723.

- Hitzeman, R.A., Leung, D.W., Perry, L.J., Kohr, W.J., Levine, H.L. and Goeddel, D.V. 1983. Secretion of human interferons by yeast. *Science* 219: 620-625.
- Holland, J.P. and Holland, M.J. 1980. Structural comparison of two nontandemly repeated yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* 255: 2596-2605.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Horowitz, B., Eakle, K.A., Scheiner-Bobis, G., Randolph, G.R., Chen, C.Y., Hitzeman, R. and Farley, R.A. 1990. Synthesis and assembly of functional mammalian Na,K-ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 4189-4192.
- Horwitz, A.H., Chang, C.P., Better, M., Hellstrom, K.E. and Robinson, R.R. 1988. Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8678-8682.
- Huang, R.B., Andrews, B.A. and Asenjo, J.A. 1991. Differential product release from yeast: a new technique for selective product recovery from microbial cells. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 977-985.
- Hunter, J.B. and Asenjo, J.A. 1987. Kinetics of enzymatic lysis and disruption of yeast cells: I. Evaluation of two lytic systems with different properties. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 471-480.
- Huston, J.S., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., McCartney, J., Warren, F., Haber, E. and Oppermann, H. 1991. Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods Enzymol.* 203: 46-88.
- Ibba, M., Kuhla, J., Smith, A. and Küenzi, M. 1993. Stable continuous constitutive expression of a heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* without selection pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 526-531.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. 1990. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press Inc. San Diego, California, USA.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K. and Oshima, Y. 1993. *MKK1* and *MKK2*, encoding *Saccharomyces cerevisiae* MAP kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13: 3076-3083.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-168.
- Jansen, K.U., Conroy, W.G., Claudio, T., Fox, T.D., Fujita, N., Hamill, O., Lindstrom, J.M., Luther, M., Nelson, N., Ryan, K.A., Sweet, M.T. and Hess, G.P. 1989. Expression of the four subunits of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 264: 15022-15027.
- Jigami, Y., Muraki, M., Harada, N. and Tanaka, H. 1986. Expression of synthetic human-lysozyme gene in *Saccharomyces cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene* 43: 273.
- Jimenez A. and Davies, J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* 287: 869-871.
- Johnson, G.L. and Vaillancourt, R.R. 1994. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 230-238.
- Johnson, S. and Bird, R.E. 1991. Construction of single-chain Fv derivatives monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98.
- Johnston, J.R. and Mortimer, R.K. 1959. Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J. Bacteriol.* 78: 292.
- Johnston, M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51: 458-476.

- Jones, E.W. 1991a. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194: 428-453.
- Jones, E.W. 1991b. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266: 7963-7966.
- Kingsman, A.J., Adams, S.E., Burns, N.R. and Kingsman, S.M. 1991. Retroelement particles as purification, presentation and targeting vehicles. *TIBTECH* 9: 303-309.
- Klis, F.M. 1994. Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10: 851-869.
- Kotula, L. and Curtis, J. 1991. Evaluation of foreign gene codon optimisation in yeast: expression of a mouse Ig kappa chain. *Bio/Technology* 9: 1386-1389.
- Kukuruzinska, M.A., Bergh, M.L.E. and Jackson, B.L. 1987. Protein glycosylation in yeast. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 915-944.
- Kuo, G., Choo, Q. L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, A.G., Porcell, R.H., Miyamura, T., Dienstag, J.L., Alter, M.J., Stevens, C.E., Tegtmeier, G.E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W. S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, L.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. 1989. An assay for circulating antibodies to a mayor etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 244: 362-364.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 777-785.
- Lee, K.S. and Levin, D.E. 1992. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein Kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell Biol.* 12: 172-182.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Nishida, E., Matsumoto, K. and Levin, D.E. 1993. A yeast MAP kinase homolog (*MPK1*) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13: 3067-3075.
- Levin, D.E. and Bartlett-Heubusch, E. 1992. Mutants in the *Saccharomyces cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116: 1221-1229.
- Livi, G.P., Lillquist, J.S., Miles, L.M., Ferrara, A., Sathe, G.M., Simon, P.L., Meyers, C.A., Gorman, J.A. and Young, P.R. 1991. Secretion of N-glycosylated interleukin-1b in *Saccharomyces cerevisiae* using a leader peptide from *Candida albicans*. Effect of N-linked glycosylation on biological activity. *J. Biol.Chem.* 266: 15348-15355.
- Loison, G., Nguyen-Juilleret, M., Alouani, F. and Marquet, M. 1986. Plasmid-transformed *URA3 FUR1* double-mutants of *S. cerevisiae*: an autoselection system applicable to the production of foreign proteins. *Bio/Technology* 4: 433-437.
- Loison, G., Vidal, A., Findeli, A., Roitsch, C., Balloul, J.M. and Lemoine, Y. 1989. High level of expression of a protective antigen of schistosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5: 497-507.
- Long, E.O., Rosen-Brinson, D.R., Karp, D., Malnati, M., Sekaly, R.P. and Jaraquemada, D. 1991. Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and limphoid cells. *Human Immunology* 31: 229-235.
- Lopes, T.S., Klootwijk, J., Veenstra, A.E., van der Aar, P.C., van Heerikhuizen, H., Raue, H.A. and Planta, R.J. 1989. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. *Gene* 79: 199-206.
- Lopes, T.S., Hakaart, G. J., A.J., Koerts, B.L., Raue, H.A. and Planta, R.J. 1990. Mechanism of high-copy-number integration of pMIRY-type vectors into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 105: 83-90.
- Lorincz, A.T. and Reed, S.I. 1984. Primary structure homology between the product of yeast division control gene *CDC28* and vertebrate oncogenes. *Nature* 307: 183-185.

- Ludwig, D.L., Ugolini, S. and Bruschi, C.V. 1993. High-level heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* from a stable 2mm plasmid system. *Gene* 132: 33-40.
- Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M. and Nombela, C. 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue slt2p is critically required for cell integrity at 37°C. *Mol. Gen. Genet.* 241: 177-184.
- Mason, C.A. 1991. Physiological aspects of growth and recombinant DNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 59: 269-283.
- McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. and Hilleman, M.R. 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178-180.
- Mechler, B., Hirsch, H.H., Müller, H. and Wolf, D.H. 1988. Biogenesis of the yeast lysosome: biosynthesis and maturation of proteinase yscB. *EMBO J.* 7: 1705.
- Meilhoc, E., Masson, J. M. and Tessie, J. 1990. High efficiency transformation of intact yeast cells by electroporation. *Biol/Technology* 8: 223-227.
- Melnick, L.M., Turner, B.G., Puma, P., Price-Tillotson, B., Salvato, K.A., Dumais, D.R., Moir, D.T., Broeze, R.J. and Avgerinos, G.C. 1990. Characterisation of a nonglycosylated single chain urinary plasminogen activator secreted from yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 801-807.
- Mellor, J., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Tuite, M.F., Emtage, J.S., White, S., Lowe, P.A., Patel, T., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M. 1983. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 24: 1-14.
- Merril, C.R., Goldman, D. and Van Keuren, M.L. 1982. Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* 3: 17-21.
- Napp, S.J. and Dasilva, N.A. 1993. Enhancement of cloned gene product synthesis via autoselection in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 801-810.
- Navarro, F., Sánchez, M., Pla, J. and Nombela, C. 1995. Functional characterization of the *MKC1* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol. Cell Biol. (In press)*.
- Oberto, J. and Davinson, J. 1985. Expression of chicken egg white lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 40: 57.
- Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. and Rothstein, R.J. 1983. Genetic applications of yeast transformations with linear and gapped plasmids. *Meth. Enzymol.* 101: 228-245.
- Ostman, A., Backstrom, G., Fong, N., Betsholtz, C., Wernstedt, C., Hellman, U., Westermarck, B., Valenzuela, P. and Heldin C-H. 1989. Expression of three recombinant homodimeric isoforms of PDGF in *Saccharomyces cerevisiae*, evidence for difference in receptor binding and functional activities. *Growth Factors* 1: 271-281.
- Paravicini, G., Cooper, M., Fiedli, L., Smith, D.J., Carpentier, J.L., Klig, L.S. and Payton, M.A. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional *PKC1* gene product. *Mol. Cell Biol.* 12: 4396-4905.
- Parent, S.A., Fenimore, C.M. and Bostian, K.A. 1985. Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1: 83-138.
- Perlman, D., Halvorson, H.O. and Cannon, L.E. 1982. Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same structural gene differ by a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 781-785.
- Pohlig, G., Zimmermann, W. and Heim, J. 1991. Influence of yeast proteases on hirudin expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed. Biochim. Acta* 50: 711-716.
- Porro, D., Martegani, E., Tura, A. and Ranzi, B.M. 1991. Development of a pH-controlled fed-batch system for budding yeast. *Res. Microbiol.* 142: 535-539.

- Price, V.L., Taylor, W.E., Clevenger, Worthington, M. and Young, E.T. 1990. Expression of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* using *ADH2* promoter. *Meth. Enzymol.* 185: 308-318.
- Pringle, J.R. 1975. Methods for avoiding proteolytic artifacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts. *Methods Cell Biol.* 12: 149-184.
- Purvis, I.J., Chotai, D., Dykes, C.W., Lubahn, D.B., French, F.S., Wilson, E.M. and Hobden, A.N. 1991. An androgen-inducible expression system for *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 106: 35-42.
- Rech, S.B., Stateva, L. and Oliver, S.G. 1992. Complementation of the *Saccharomyces cerevisiae* *Srb1-1* mutation. An autoselection system for stable plasmid maintenance. *Curr. Genet.* 21: 339-344.
- Romanos, M.A., Beesley, K.M. and Clare, J.J. 1991a. Direct selection of stabilised yeast *URA3* transformants with 5-fluorouracil. *Nucleic Acids Res.* 19: 187.
- Romanos, M.A., Clare, J.J., Beesley, K.M., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Makoff, A.J., Dougan, G., Fairweather, N.F. and Charles, I.G. 1991b. Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* 9: 901-906.
- Romanos, M.A., Makoff, A.J., Fairweather, N.F., Beesley, K.M., Slater, D.E., Rayment, F.B., Payne, M.M. and Clare, J.J. 1991c. Expression of tetanus toxin fragment C in yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acids Res.* 19: 1461-1467.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-488.
- Rosenberg, S., Barr, P.J., Najarian, R.C. and Hallewell, R.A. 1984. Synthesis in yeast of a functional oxidation resistant mutant of human α_1 -antitrypsin. *Nature* 312: 77-80.
- Rossini, D., Porro, D., Brambilla, L., Venturini, M., Ranz, B.M., Vanoni, M. and Alberghina, L. 1993. In *Saccharomyces cerevisiae*, protein secretion into the growth medium depends on environmental factors. *Yeast* 9: 77-84.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J. and Moir, D.T. 1989. The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca^{+2} ATPase family. *Cell* 58: 133-145.
- Ruohonen, L., Hackman, P., Lehtovaara, P., Knowles, J.K.C. and Keränen, S. 1987. Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase by its own signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* host cells. *Gene* 59: 161-170.
- Saiki, R.K., Schaif, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G.T. and Erlich, H.A. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sakai, A., Ozawa, F., Higashizaki, T., Shimizu, Y. and Hishinuma, F. 1991. Enhanced secretion of human nerve growth factor from *Saccharomyces cerevisiae* using an advanced d-integration system. *Bio/Technology* 9: 1382-1385.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd edn., Cold Spring Harbor, NY.
- Sato, T., Uemura, H., Izumoto, Y., Nakao, J., Nakamura, Y. and Matsubara, K. 1989. The conformation of mature α -amylase conditions its secretion from yeast. *Gene* 83: 355-365.
- Schena, M., Picard, D. and Yamamoto, K.R. 1991. Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Meth. Enzymol.* 194: 389-398.
- Schultz, L.D., Tanner, J., Hofmann, K.J., Emini, E.A., Condra, J.H., Jones, R.E., Kieff, E. and Ellis, R.W. 1987. Expression and secretion in yeast of a 400-kDa envelope glycoprotein derived from Epstein-Barr virus. *Gene* 54: 113-123.

- Schütte, H. and Kula, M.R. 1990. Pilot and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12: 599-620.
- Shah, D.N., Purohit, A.P. and Sriprakash, R.S. 1982. Preliminary studies on a citric acid producing strain of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 4: 69-83.
- Sharp, P.M. and Cowe, E. 1991. Synonymous codon usage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7: 657-678.
- Shaw, W.V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol resistant bacteria. *Methods Enzymol.* 43: 737-755.
- Shaw, W.V. 1983. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14: 1-46.
- Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, B. 1986. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shortle, D., Novick, P. and Botstein, D. 1984. Construction and genetic characterisation of temperature-sensitive mutant alleles of the yeast actin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4889-4893.
- Shuster, J.R. 1991. Gene expression in yeast: protein secretion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 685-690.
- Sledziewski, A.Z., Bell, A., Yip, C., Kelsay, K., Grant, F.J. and MacKay, V.L. 1990. Superimposition of temperature regulation on yeast promoters. *Meth. Enzymol.* 185: 351-366.
- Sleep, D., Belfield, G.P., Ballance, D.J., Steven, J., Jones, S., Evans, L.R., Moir, P.D. and Goodey, A.R. 1991. *Saccharomyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. *Bio/Technology* 9: 183-187.
- Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science* 230: 1219-1224.
- Song, M.R., Lee, D.W., Park, S.W. and Park, H.M. 1992. Isolation and characterization of b(1,3)glucan synthase defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8: S516.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P. and Parker, K. 1989. High level expression purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem.* 28: 4117-4125.
- Stateva, L., Venkow, P., Lyutskanov, N., Koleva, L. and Hadjiolov, A. 1990. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Construction of strains and conditions. *J. Basic Microbiol.* 30: 535-540.
- Stern, L.J., Wiley, D.C. 1992. The human class II MHC protein HLA-DR1 assembles as empty ab heterodimers in the absence of antigenic peptide. *Cell* 68: 465-477.
- St. John, T.P. and Davis, R.W. 1981. The organisation and transcription of the galactose gene cluster of *Saccharomyces*. *J. Mol. Biol.* 152: 285-315.
- Struhl, K. 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 1051-1077.
- Sutton, A. and Broach, J.R. 1985. Signals for transcription initiation and termination in the *Saccharomyces cerevisiae* plasmid 2 μ m circle. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2770-2780.
- Thim, L., Hansen, M.T., Norris, K., Hoegh, I., Boel, E., Forstrom, J., Ammerer, G. and Fiil, N.P. 1986. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6766-6770.
- Thomsen, K.K. 1983. Mouse α -amylase synthesised by *Saccharomyces cerevisiae* is released into the culture medium. *Carlsberg Res. Commun.* 48: 545.

- Titchener-Hooker, N.J., Hoare, M. and Dunnill, P. 1989. New approaches to the more efficient purification of proteins and enzymes. *Annals New York Academy of Sciences*, 157-171.
- Torres, L., Martín, H., García-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. and Nombela, C. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol. Microbiol.* 5: 2845-2854.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C. and Gingeras, T.R. 1987a. Expression of the *lacZ* gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nuc. Acids Res.* 15: 3859-3876.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. and Grinna, L. 1987b. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5: 1305-1308.
- Tuite, M.F., Dobson, M.J., Roberts, N.A., King, R.M., Burke, D.C., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. 1982. Regulated high efficiency expression of human interferon-alpha in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1: 603-608.
- Turner, B.G., Avgerinos, G.C., Melnick, L.M. and Moir, D.T. 1991. Optimisation of prourokinase secretion from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 869-875.
- Unanue, E.R. and Allen, P.M. 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236: 551-557.
- Unternährer, S., Pridmore, D. and Hinnen, A. 1991. A new system for amplifying 2mm plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 5: 1539-1548.
- Urdea, M.S., Merryweather, J.P., Mullenbach, D.C., Corr, D., Heberlein, U., Valenzuela, P. and Barr, P.J. 1983. Chemical synthesis of a gene for human epidermal growth factor urogastrone and its expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7461-7465.
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. and Hall, B.D. 1982. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 298: 347-350.
- Vedvick, T., Buckholz, R.G., Engel, M., Urcan, M., Kinney, J., Provow, S., Siegel, R.S. and Thill, G.P. 1991. High-level secretion of biologically active aprotonin from the yeast *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* 7: 197-201.
- Vogel, K. and Hinnen, A. 1990. The yeast phosphatase system. *Mol. Microbiol.* 4: 2013-2017.
- Vogel, V., Wolff, C., Kargel, E. and Schunk, W.H. 1992. Improved immunocytochemistry of yeast cells. *Yeast* 8: S529.
- Wagenbach, M., O'Rourke, K., Vitez, L., Wiczorek, A., Hoffman, S., Durfee, S., Tedesco, J. and Stetler, G. 1991. Synthesis of wild type and mutant hemoglobins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology* 9: 57-61.
- Webster, T.D. and Dickson, R.C. 1983. Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin resistance gene of Tn903. *Gene* 26: 243-252.
- Wegner, E.H. 1983. Biochemical conversions by yeast fermentation at high-cell densities. U.S. patent 4414329.
- Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. 1992. The activity of a model heterologous protein in *pep4-3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 754-758.
- Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. 1993. Increased activity of a model heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* strains with reduced vacuolar proteinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 211-215.
- Wood, C.R., Boss, M.A., Kenton, J.M., Calvert, J.E., Roberts, N.A. and Emtage, J.S. 1985. The synthesis and *in vivo* assembly of functional antibodies in yeast. *Nature* 314: 446-449.

Zaret, K.S. and Sherman, F. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell* 28: 563-573.

VII. ANEXO

A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity

Pablo Alvarez, Marta Sampedro, María Molina, César Nombela *

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Plaza de Ramón y Cajal, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

Received 27 July 1994; revision accepted 13 September 1994

Abstract

A system has been developed for the release of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*, based on the use of thermosensitive osmotic-remedial mutants, deficient in cell integrity, that lyse at the non-permissive temperature, thus releasing the bulk of intracellular proteins and leaving behind cell ghosts and debris. The strains developed combine the *lyt2* mutation (which is allelic to gene *SLT2* / *MPK1* coding for a MAP kinase homolog), with the disruption of genes *PEP4* and *PRB1* known to produce a protease-deficient background. Cells transformed with the appropriate bacterial gene, released about 70% of the heterologous protein chloramphenicol acetyl transferase (CAT) in bioreactor cultivation upon switching growth temperature to 37°C, or by osmotic shock of the cells preincubated at 37°C in the presence of 1 M sorbitol. It is suggested that our release system could be advantageous for obtaining large-scale protein preparations for downstream processing without any mechanical breakage of the cells, enzymatic treatment or chemical extraction.

Keywords: *S. cerevisiae*; *slt2* mutant; Heterologous protein

Abbreviations: *ADCI*, gene encoding the yeast alcohol dehydrogenase I (promoter); *BCK1* / *SLK1*, gene encoding the yeast protein kinase Bck1/Slk1; CAT(CE), CAT activity measured in the soluble protein cell extract as U ml⁻¹; CAT(M), CAT activity measured in the culture medium as U ml⁻¹; *CYC1*, gene encoding the yeast cytochrome oxidase I (terminator); *MKK1* / *MKK2*, genes encoding the yeast kinases Mkk1 and Mkk2; AP(CE), AP activity measured in the soluble protein cell extract as U ml⁻¹; AP(M), AP activity measured in the culture medium as U ml⁻¹; *PEP4*, gene encoding the yeast proteinase A; %PI(–), percentage of cells do not stain with propidium iodide; *PKC1*, gene encoding the yeast kinase C; *PRB1*, gene encoding the yeast proteinase B; *SLT2* / *MPK1*, gene encoding the yeast MAP kinase homolog *Slk2*/Mpk1.

* Corresponding author.

1. Introduction

Yeasts have become well-established organisms for the expression of heterologous proteins. Although the perfect system for heterologous protein expression does not exist, many of the characteristics of yeast cells, especially their eukaryotic nature and the fact they are GRAS (generally recognized as safe) organisms, represent significant advantages for these cells to be used as hosts for the expression of proteins with medical and food applications (for a review see Romanos et al. (1992)). The use of yeast in modern biotechnology has benefited substantially from

the advances in molecular biology of *Saccharomyces cerevisiae* that allowed the development of efficient expression systems as well as the manipulation of other basic characteristics to improve the system. Other yeast species, such as *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* or *Kluyveromyces lactis* (Gellissen et al., 1992; Fleer, 1992), are also being developed as heterologous expression systems.

A major bottle-neck in the processes that employ yeast cells for expression of foreign genes occurs in the release of the corresponding protein, an essential step for the downstream operations leading to protein purification. The two basic alternatives for release of heterologous proteins, namely secretion and extraction by cell breakage or chemical treatment, are not without problems. The former obviously represents an attractive possibility because only a few proteins, in addition to the one desired, are present in a mixture of proteins secreted by yeasts (Shuster, 1991). However, it requires substantial manipulation of the gene, to introduce secretion signals, and it can be limited by low yields and postranslational modifications of the protein. Therefore, not many high added value proteins produced in yeast are secreted but remain intracellular, so that they have to be released by some kind of cell breakage treatment. Among them are hepatitis B antigen, malaria vaccine, human proinsuline, human superoxide dismutase (SOD), human fibroblast growth factor (FGF), human antitrypsin (Tekamp-Olson and Valenzuela, 1990).

Mechanical cell breakage or extraction by chemical or enzymatic treatment represents drastic procedures used for the extraction of intracellular yeast proteins that might affect the stability of the polypeptides or introduce additional impurities to be removed in the corresponding downstream operations (Schütte and Kula, 1990). In this context, the recent reports regarding treatments that lead to differential release of cell components suggest interesting developments (Huang et al., 1991; Asenjo et al., 1993).

We made use of the phenomenon of yeast cell lysis, based on the expression of mutations that lead to the formation of an altered cell wall in order to achieve the release of intracellular ho-

mologous proteins (Fuente et al., 1993). In this communication, we document that strains combining a protease-deficient background with *lyt2* trait, a thermosensitive mutation leading to cell lysis under certain conditions, can liberate the bulk of intracellular soluble components containing specific homologous and heterologous proteins, leaving behind cell ghosts and debris.

2. Material and methods

Strains

The yeast strains used in this work were: (a) LD1 (MAT a/MAT α , *lyt2-1* / *lyt2-1*, *leu2-3.112* / *leu2-3.112*, *his4 Δ 34* / *his4 Δ 34*), a diploid strain homozygotic for the mutant allele *lyt2-1* which determines autolysis of the cells when grown at the non-permissive temperature of 37°C (Fuente et al., 1992); (b) BJ5461 (MAT α , *ura3 Δ 52*, *trp1*, *leu2 Δ 1*, *lys2-801*, *his3 Δ 200*, *pep4::HIS3*, *prb1 Δ 1.6R can1*) (Jones, 1991); (c) L3c34a (MATa, *lyt2-1*, *leu2-3.112*, *ade2*, *his4 Δ 34*) (Torres et al., 1991); (d) LHDP1 (MATa, *lyt2-1*, *ade2*, *leu2-3.112*, *pep4::HIS3*, *prb1 Δ 1.6R*) a haploid proteinase-deficient strain also carrying the mutant allele *lyt2-1*; it was obtained by crossing strains BJ5461 and L3c34a, followed by sporulation of the diploid and selection of the appropriate segregants after phenotype assessment, using standard genetic techniques (Mortimer and Hawthorn, 1975). The *Escherichia coli* strain DH5 α (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, (*rk*⁻, *mk*⁺), *relA1*, *F80R*, *lacZ M15*, *F*⁻) was used as host to carry out cloning experiments and to build up a stock of plasmid.

Plasmids and cloning techniques

The shuttle plasmid pCH100 containing the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) expression cassette (Hadfield et al., 1986) was modified by insertion of the *Saccharomyces cerevisiae* *LEU2* gene as a selection marker, according to the standard cloning techniques (Sambrook et al., 1989). The new plasmid was named pCH100L (Fig. 1). Yeast transformation was carried out according to the lithium acetate procedure (Ito et al., 1983).

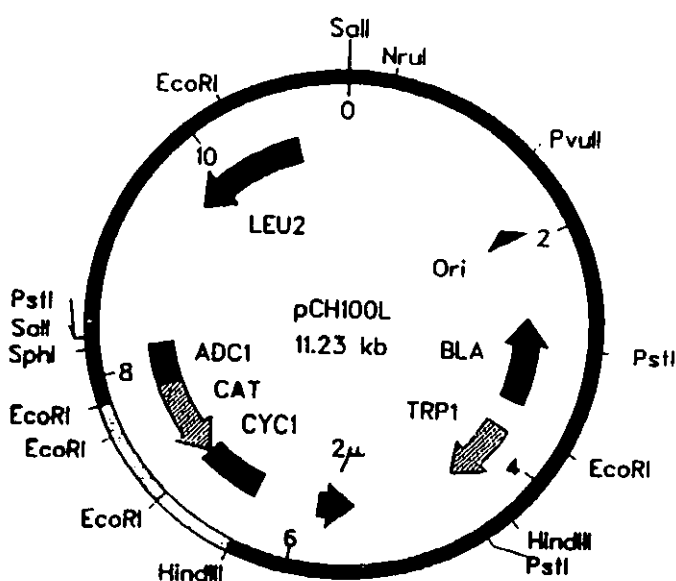


Fig. 1. Plasmid construction used to transform yeast strains for CAT production. The CAT gene is under the control of the ADC1 constitutive promoter and CYC1 terminator.

Phenotype analysis

Lytic phenotype was tested by susceptibility to 12 mM caffeine in YPD plates incubated at 24°C (in preparation) and by measurement of culture viability in liquid media at 37°C as percentage of cells that did not stain with propidium iodide, by means of flow cytometry (Fuente et al., 1992). The deficiency in carboxypeptidase Y was used to identify cells with a *pep4-3* mutation. The test is based on a plate assay using a naphthyl ester and Fast Garnet GBC salt (Sigma) as described by Jones (1991). Proteinase B activity was detected with a plate assay (Jones, 1991), using an overlay containing Hide Powder Azure (Sigma).

Media and growth conditions

Yeast cell inocula were grown in 500-ml flasks with 100 ml of medium containing yeast nitrogen base without amino acids (Difco 6.7 g l⁻¹), glucose (20 g l⁻¹) and the following auxotrophic supplements (20 mg l⁻¹): adenine, uracil, tryptophan, histidine and lysine. The cultures were grown in an orbital incubator shaker at 24°C and 200 rpm until exponential phase. Batch cultivation was carried out in a 15-l Biostat E bioreactor (Braun-Diessel, Melsungen, Germany) with a working volume of 10 l of YEPD containing yeast

extract (10 g l⁻¹), glucose (20 g l⁻¹) and peptone (20 g l⁻¹). Media were inoculated with 100 ml of exponentially growing cell suspensions and incubated at 24°C. When required, the temperature was raised to 37°C around an OD₆₀₀ of 1 to 2. Aeration was kept at 2 l min⁻¹ and stirrer speed at 250 rpm. Optical density of the cell suspensions was measured at 600 nm (OD₆₀₀) in a Beckman DU640 spectrophotometer. Viability was expressed as we describe in phenotype analysis.

Analytical determinations

Alkaline phosphatase was assayed as described by Cabib and Duran (1975) with *p*-nitrophenyl-phosphate as substrate. CAT activity was measured as described by Shaw (1975) with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) as substrate. Total protein was determined by the commercial Bradford method (Bio-Rad).

Plasmid stability during batch cultivation in bioreactor was estimated by washing the cells in water and then plating onto duplicate selective and non-selective plates (200–500 colonies per plate). The ratio of the colonies on the selective versus the non-selective plates determined the proportion of plasmid-containing cells in the culture.

3. Results

3.1. CAT production and release from yeast lytic strains

As we have previously shown, the autolytic diploid strain *S. cerevisiae* LD1 (previously named D(4a × 4a')) (*lyt2-1*) is able to release the bulk of intracellular proteins to the culture medium (Fuente et al., 1993) upon expression of the *lyt2-1* mutation (Torres et al., 1991) when cells are grown at 37°C. In order to evaluate the ability of these mutant strains to release heterologous proteins produced intracellularly and, therefore, non-secreted to the culture medium, we chose chloramphenicol acetyl transferase (CAT) as reporter protein. The corresponding gene of bacterial origin can be expressed intracellularly in yeast (Hadfield et al., 1987) and assayed by spectropho-

tometric means (Shaw, 1975). To carry out these experiments we transformed various lytic and non-lytic strains with pCH100L, an episomal plasmid that carries the CAT expression cassette (Fig. 1).

S. cerevisiae LD1/pCH100L exhibited growth-associated CAT production, when growing in batch conditions, as expected for a protein expressed under the control of the constitutive promoter ADC1 (alcohol dehydrogenase I). Cells grew stably at 24°C so that the culture maintained viability and neither significant levels of protein nor CAT activity were detected in the external

medium (Fig. 2A). However, upon switching the temperature to 37°C the expression of the thermosensitive mutation brought about cell lysis, so that cell viability dropped to 20% in 6 h. This was accompanied by a 3-fold increase of the total protein in the medium as well as the release of a significant amount of CAT. After 6 h, the optical density of the culture continued to increase, indicating that a fraction of the cell population continued growing and presumably lysing, but neither the protein concentration nor the activity of CAT in the medium increased. Instead, they dropped significantly and eventually disappeared

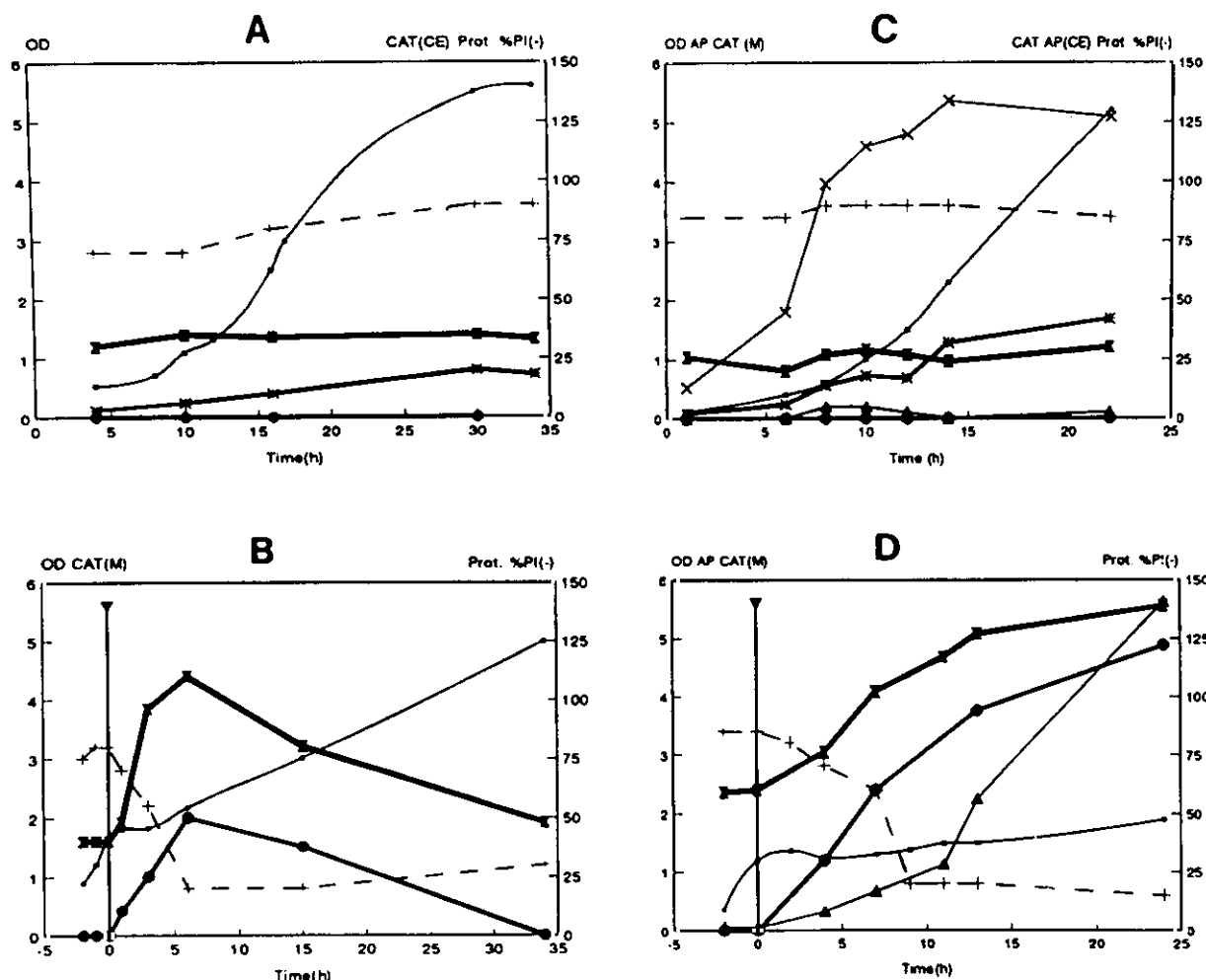


Fig. 2. Release of intracellular homologous and heterologous proteins from *S. cerevisiae* LD1 (A,B) and LHDP1 (C,D) strains transformed with plasmid pCH100L upon expression of *lyr2* mutation. 10-l cultures were incubated at 24°C and either maintained at this temperature (A,C) or shifted to 37°C (B,D) (▼, temperature shift). The following parameters were determined: +, viability measured as percentage of PI(-) cells; ■, optical density at 600 nm (OD); —, total protein in the medium (Prot.); *, chloramphenicol acetyl transferase activity (CAT) in cell extracts (CE) and ●, culture medium (M) as U ml⁻¹; ×, alkaline phosphatase activity (AP) in cell extracts (CE) and ▲, culture medium (M) as U ml⁻¹.

(Fig. 2B). These observations demonstrated the ability of *lyt2* mutant strains to release intracellular heterologous proteins, such as CAT, based on the lysis of cells conferred by the *lyt2-1* mutation. After 6 h at 37°C, however, the corresponding cell lysis was not paralleled by an increase in the level of enzyme in the medium, most probably due to the release of vacuolar proteases leading to unspecific proteolytic degradation. Similar proteolytic degradations have been reported for alkaline phosphatase (Fuente et al., 1993) and for hirudin expressed in *S. cerevisiae* (Ibba et al., 1993).

In an attempt to prevent the aforementioned proteolysis, we constructed a new *lyt2-1* strain, that was protease deficient, due to *pep4* and *prb1* mutations. It is well known that a variety of proteases activated by the *PEP4* gene product are responsible for yeast vacuolar degradation (Hirsch et al., 1989). The usual approach to reduce proteolytic degradation in a strain is to introduce *pep4* mutation because it is pleiotropic and results in 90% reduced activity of the four major vacuolar proteases, namely Pra1, Prb1, Prc1 and Cps1 (Jones et al., 1982), thus minimizing their levels in the cell. These strains have been successfully used in the production of β -lactamase (Roggenkamp et al., 1985), α_1 -antitrypsin (Chabazon et al., 1984) and β -galactosidase (Wingfield and Dickinson, 1992). However, there is also evidence that yeast *pep4* strains can still produce the precursor of protease B which is considered a source of proteolytic problems (Pringle, 1975), for example, in the production of tissue plasminogen activator (tPA) (Heim et al., 1985). Therefore, the best strain should be a *pep4 prb1* double mutant deficient in precursor B with a much reduced risk of proteolysis during cell lysis.

We constructed the lytic strain LHDP1 (*lyt2-1*, *pep4*, *prb1*), that was transformed with pCH100L in order to analyze its capacity to release CAT in 10-l bioreactor batch cultivation. In this case, we followed the liberation of both the heterologous CAT protein and the homologous alkaline phosphatase (AP) to the medium (Fig. 2C). Cells grew stably at 24°C without any release of bulk protein, CAT or AP. The temperature switch to 37°C

again determined a drop in cell viability and an increase in total protein (2.5-fold) in the medium of similar extents to those observed in cultures of LD1. AP and CAT were released as well, but both activities remained stable for a long time so that their level in culture media showed a sustained increase for extended periods of time (Fig. 2D). It follows that the inactivation of the protease genes prevents degradation of the enzyme activities released to the culture medium by yeast autolytic strains. All the batch culture experiments were carried out in a non-selective medium, such as YEPD, because it allows a more intense expression of the lytic phenotype due to faster growth. We have tested plasmid stability under these conditions of growth and more than 75–80% of the cells remained plasmid-bearing cells when the temperature was switched to 37°C.

To carry out a rapid comparison of the proteins present in the preparations released by cell lysis with the ones present in cell-free extracts we analyzed these preparations by one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis. Both patterns were very similar (data not shown) indicating that the proteins released upon lysis were representative of the bulk of intracellular proteins.

3.2. Release of proteins by osmotic shock

The lytic phenotype determined by *lyt2-1* trait can be complemented by osmotic stabilization in 1 M sorbitol, suggesting that this mutation determines a deficiency in cell integrity possibly due to an alteration in cell wall formation (Torres et al., 1991). In order to examine the possibility of achieving protein release by a simple treatment such as osmotic shock, rather than a temperature switch in cultures followed by sustained incubation under those conditions, we analyzed the possibility of releasing proteins from cells incubated at the non-permissive temperature but protected by the osmotic stabilizer sorbitol. As shown in Fig. 3, by osmotic shock of *lyt2* cells, previously grown at 37°C and protected by the presence of 1 M sorbitol, the release could be achieved of approx. 70% of the intracellular CAT activity, the other 30% remaining cell bound. The protease-deficient, non-lytic strain BJ5461 that was used as

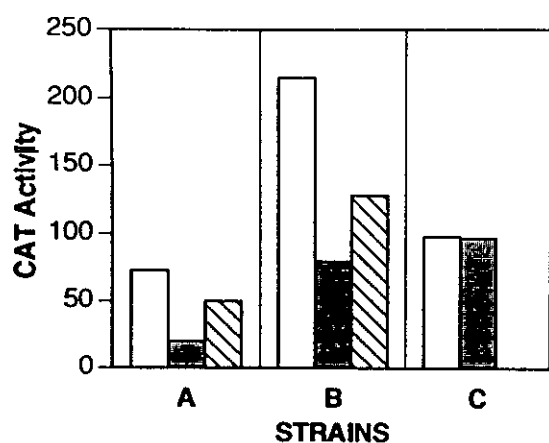


Fig. 3. Release of heterologous CAT protein upon osmotic shock of *lyt2* strains. Cultures for osmotic shock experiments were grown on 500-ml shake flasks with 100 ml of YEPD plus 1 M sorbitol at 37°C in an orbital incubator, centrifuged and resuspended in an equal volume of 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Samples of identical cell density were taken and CAT activity determined in cell extracts, medium or buffer. Strains: LD1 (A), LHDP1 (B), BJ5461 (C). CAT activity inside cells growing at 37°C plus sorbitol 1 M (open bars); CAT activity inside cells after osmotic shock (solid bars); CAT activity in buffer after osmotic shock (stripped bars). CAT activity is expressed as total enzymatic units per sample.

a control did not release any CAT activity under the same conditions. These results also illustrate very clearly that both strains (protease plus and minus) released the same proportion of intracellular CAT upon osmotic shock, but the absolute amount of the heterologous protein was much higher in the protease-deficient strain so that the yield was almost 3-fold.

4. Discussion

The evidence presented in this paper shows that *S. cerevisiae* strains carrying *lyt2* mutation, that determines a thermosensitive sorbitol-remedial lytic phenotype, combined with the disruption of genes *PEP4* and *PRB1*, that lead to a protease-deficient background, can be used for the simple release of intracellular heterologous proteins in high yields. An important advantage of the use of this system can be based on the significant knowledge that exists regarding the functions affected in *lyt2* mutants. *lyt2* mutations

are allelic to gene *SLT2/MPK1*, that codes for a MAP (mitogen-activated protein) kinase involved in the signalling cascade initiated with the kinase coded by gene *PKC1* (Lee et al., 1993). Therefore, many types of *slt2* strains available (deletion, point mutations in essential amino acids) that are affected in cell integrity at 37°C, and many others that could be developed would be appropriate in this regard.

Recently, a method based on the use of osmotically fragile *S. cerevisiae srb1* mutant strains for isolation of recombinant proteins was described (Bröcker, 1994). The yield of heterologous protein obtained by this method was only 20% compared with 100% value obtained by mechanical breakage. Our results clearly show that at least 70% of the activity of a model heterologous protein expressed in yeast, such as CAT, can be released from yeast cells either by growth of the *lyt2* strain at the non-permissive temperature of 37°C in the absence of any osmotic stabilizer or by osmotic shock of cells grown at this temperature but protected by 1 M sorbitol during growth. The bulk of the protein released from the cells by either means can be separated from cell ghosts and debris by centrifugation, thus obtaining a protein fraction. Our observations regarding stabilization of the cells expressing the lytic phenotype also indicate that the sorbitol concentration needed could be reduced to around 0.5 M. The advantages of using protease-deficient strains (a *pep4 prb1* background) is also clear from our evidence that shows a 3-fold increase in the amount of CAT protein released. This is consistent with the several observations made in *S. cerevisiae*, such as the improvement in the yield of hirudin in a *pep4 prc1* strain (Pohlig et al., 1991) and the increase in β -galactosidase yield in strains deficient in vacuolar proteases (Wingfield and Dickinson, 1992, 1993) or with the 1.5-fold increase in IGF-1 yield achieved in a *pep4* mutant of *Pichia pastoris* (Cregg et al., 1993). According to Hirsch et al. (1989) and Romanos et al. (1992) we can consider that the better yields obtained with protease-deficient strains is due to reduced product degradation rather than increased synthesis which in turn must provide a better quality of the product with smaller amounts of impurities

due to degradation products. With the protease-deficient strains, we not only achieve better yields of the heterologous protein but we also obtain much more stable preparations.

The pattern of proteins released to the culture medium was quite similar to that of proteins present in cell extracts. This indicates that the system could be used for the production of any heterologous protein that is adequately expressed intracellularly in yeast. Our release system can be used by growing cells at the non-permissive temperature of 37°C, either unprotected or in the presence of an osmotic stabilizer followed by osmotic shock. This system could present advantages for large-scale production compared to the release by mechanical breakage that requires tough breaking procedures and can lead to homogenates in which cell walls break into small pieces. It also has the obvious advantage of not requiring any defined enzymatic (Huang et al., 1991; Asenjo et al., 1993) or chemical (Breddam and Beenfeldt, 1991) treatment that add further impurities to the preparation. Our system, moreover, has been shown to release bulk protein in two-step continuous cultivation (Fuente et al., 1993) which should also work adequately for heterologous protein release.

The conservation of many of the basic features controlling cell functions in yeast makes it feasible to isolate and disrupt the gene homologous to *SLT2* from other yeast species useful for the expression of heterologous proteins, in order to develop a similar system for protein release. Even though the system does not permit a selective release, we have further studies in progress to manipulate the genes involved in the control of cell wall autolysis in order to improve the expression of mutations under the adequate conditions and with the most efficient protein release. The system is also being tested regarding the possibility of being used for other types of heterologous proteins.

Acknowledgements

This investigation was supported by grants BIOT-CT90–165 (BRIDGE) from the European

Commission and PB91-919-01 from DIGICYT (Spain). We wish to thank C. Viñambres and Dr. J. de la Fuente for initial work and plasmid construction, Dr. C. Hadfield for supplying plasmid pCH100, and A. Alvarez for the FACS determinations.

References

- Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. (1993) Selective release of recombinant protein particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. *Bio/Technology* 11, 214–217.
- Breddam, K. and Beenfeldt, T. (1991) Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 323–329.
- Bröcker, M. (1994) Isolation of recombinant proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by use of osmotically fragile mutant strains. *BioTechniques* 16, 604–610.
- Cabib, E. and Duran, A. (1975) Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at non-permissive temperatures. *J. Bacteriol.* 124, 1604–1606.
- Chabazon, T., De Wilde, M., Herion, P., Lorian, R. and Bollen, A. (1984) Expression of human α_1 -antitrypsin cDNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6594–6598.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. and Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11, 905–910.
- Fleer, R. (1992) Engineering yeast for high level expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 486–496.
- Fuente, J.M. de la, Alvarez, A., Nombela, C. and Sanchez, M. (1992) Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. *Yeast* 8, 39–45.
- Fuente, J.M. de la, Vazquez, A., Gonzalez, M., Sanchez, M., Molina, M. and Nombela, C. (1993) Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 763–769.
- Gellissen, G., Melber, K., Janowicz, Z.A., Dahlems, U.M., Weydemann, U., Piontek, M., Strasser, A.W.M. and Hollenberg, C.P. (1992) Heterologous protein production in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 62, 79–93.
- Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. (1986) An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 45, 149–158.
- Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. (1987) Sequence and expression characteristics of a shuttle chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 52, 59–70.
- Heim, J., Treichler, H.J., Hanni, C., Meyhack, B. and Hinnen, A. (1985) Biochemical characterization of recombinant mature t-PA and acid phosphatase t-PA hybrids in yeast. EMBO Workshop. Amalfi (Abstr.).

- Hirsch, H.H., Suarez-Rendueles, P. and Wolf, D.H. (1989) Yeast proteinases: structure, characteristics and function. In: Walton, E.F. and Yarranton, G.T. (Eds.) *Molecular and Cell Biology of Yeast*. Blackie and Son Ltd., London, pp. 134–200.
- Huang, R.B., Andrews, B.A. and Asenjo, J.A. (1991) Differential product release from yeast: a new technique for selective product recovery from microbial cells. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 977–985.
- Ibba, M., Kuhla, J., Smith, A. and Küenzi, M. (1993) Stable continuous constitutive expression of a heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* without selection pressure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 526–531.
- Ito, H., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168.
- Jones, E.W., Zubenko, G.S. and Parker, R.R. (1982) PEP4 gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 102, 665–675.
- Jones, E.W. (1991) Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194, 428–453.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. and Levin, D.E. (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 12, 172–182.
- Mortimer, R.K. and Hawthorn, D.C. (1975) Genetic mapping in yeast. *Methods Cell Biol.* 11, 221–233.
- Pohlig, G., Zimmermann, W. and Heim, J. (1991) Influence of yeast proteases on hirudin expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed. Biochim. Acta* 50, 711–716.
- Pringle, J.R. (1975) Methods for avoiding proteolytic artifacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts. *Methods Cell Biol.* 12, 149–184.
- Roggenkamp, R., Dargatz, H. and Hollenberg, C.P. (1985) Precursor of β -lactamase is enzymatically inactive. *J. Biol. Chem.* 260, 1508.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423–488.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edn., Cold Spring Harbor, NY.
- Schütte, H. and Kula, M.R. (1990) Pilot and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12, 599–620.
- Shaw, W.V. (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol resistant bacteria. *Methods Enzymol.* 43, 737–755.
- Shuster, J.R. (1991) Gene expression in yeast: protein secretion. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 685–690.
- Tekamp-Olson, P. and Valenzuela, P. (1990) Gene expression and engineering in yeast and other fungi. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1, 28–35.
- Torres, L., Martin, H., Garcia-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M. and Nombela, C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol. Microbiol.* 5, 2845–2854.
- Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. (1992) The activity of a model heterologous protein in *pep4-3* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 754–758.
- Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. (1993) Increased activity of a model heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* strains with reduced vacuolar proteinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 211–215.



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

DISEÑO Y GRÁFICO

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

NUMERO DE SOLICITUD

P9401536

FECHA DE PRESENTACION

94 JUN 14 12:41

- ☒ PATENTE DE INVENCION
☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI
	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID		02010141

(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
	DE LA FUENTE CARRETERO MOLINA MARTIN MOLINA CAVO	JESUS MARIA CESAR	25 25 15

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR:	FECHA:

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD

P 9 4 0 1 5 3 6

FECHA DE PRESENTACION

30 JUL 19 12

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas *Saccharomyces cerevisiae*, basado en la sensibilidad osmótica que confiere la mutación *slt2* a la temperatura de 37°C. Esta sensibilidad osmótica puede ser utilizada para la liberación del contenido intracelular bien por cambio en la temperatura del cultivo de 24° a 37°C, o bien por transferencia de células crecidas en medio estabilizado osmóticamente a esta última temperatura a un medio no estabilizado. En ambos casos las células se lisan liberando su contenido intracelular obteniéndose, tras una centrifugación que elimina los restos celulares, una preparación de proteínas apta para iniciar un proceso de purificación de la proteína de interés. Este procedimiento resulta un abaratamiento del proceso al evitar el uso de maquinaria y la preparación de proteínas que se obtiene contiene menos impurezas que la obtenida por otros procesos.

GRAFICO



(31) NUMERO

(32) FECHA

(33) PAIS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(41) NUMERO DE SOLICITUD

P9401536

(22) FECHA DE PRESENTACION

14.07.94

(71) SOLICITANTE(S)

NACIONALIDAD

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

ES

DOMICILIO

RECTORADO. Avda. de Séneca, 2 - 28040 MADRID

(72) INVENTOR(ES)

Alvarez Alvarez, Pablo// Sampedro Martínez, Marta// de la Fuente Carretero, Jesús//
Molina Martín, María// Norbela Cano, César//

(73) TITULAR(ES)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

(11) N.º DE PUBLICACION

(45) FECHA DE PUBLICACION

(62) PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51) Int. Cl.

(54) TITULO

Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas
de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

(57) RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

RESUMEN

Se describe un procedimiento para lograr la liberación de proteínas heterólogas intracelulares en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* basado en la sensibilidad osmótica que confiere la mutación *slt2* a la temperatura de 37°C. Esta sensibilidad osmótica puede ser utilizada para la liberación del contenido intracelular bien por cambio en la temperatura del cultivo de 24° a 37°C, o bien por transferencia de células crecidas en medio estabilizado osmóticamente a esta última temperatura a un medio no estabilizado. En ambos casos las células se lisan liberando su contenido intracelular obteniéndose, tras una centrifugación que elimina los restos celulares, una preparación de proteínas apta para iniciar un proceso de purificación de la proteína de interés. Este procedimiento resulta en un abaratamiento del proceso al evitar el uso de maquinaria, y la preparación de proteínas que se obtiene contiene menos impurezas que la obtenida por otros procesos.

TITULO

Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se encuadra dentro de la Biotecnología y en concreto en el campo de la expresión, producción y liberación de proteínas heterólogas en la levadura. La invención proporciona un método para llevar a cabo dicha liberación, basado en tratamientos sencillos de determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, portadoras de una mutación que conduce a la liberación del contenido intracelular, obteniéndose de esta forma
15 preparaciones de proteínas que se separan fácilmente de la mayor parte de los materiales celulares indeseables presentes en dichas preparaciones, tales como paredes celulares. Las preparaciones de proteínas así obtenidas pueden ser sometidas a los procesos de extracción y purificación correspondientes. La mutación de la que son portadoras las células de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el procedimiento objeto de esta invención afecta al
20 gen denominado *SLT2*; como consecuencia de dicha mutación las células pierden su integridad en determinadas condiciones lo que conduce a la liberación de su contenido de proteínas solubles. El conocimiento existente acerca de la función del citado gen, en buena medida desarrollado en nuestro laboratorio, permite aprovechar las características de este tipo de células mutantes para optimizar dicha liberación de proteínas. El procedimiento objeto de
25 esta invención representa una alternativa a otros procedimientos de liberación de proteínas heterólogas de levadura tales como la rotura mecánica, química o enzimática de la integridad celular.

ANTECEDENTES

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo bien conocido y utilizado ampliamente en Biotecnología para la expresión y producción de proteínas heterólogas.

5 Destacan varias características de esta especie en relación con la utilidad de la misma:

- es un organismo eucariótico.

10 - se trata de un organismo del tipo GRAS ("Generally Recognized As Safe") según la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, es decir generalmente reconocido como seguro, por ausencia de posibles contaminantes víricos y pirógenos; esto lo convierte en un hospedador apto para la producción de proteínas con uso alimentario y terapéutico.

- existe un amplio conocimiento de su comportamiento a gran escala en fermentador por su uso en fermentaciones tradicionales.

15 Las levaduras se utilizan para producir una serie de proteínas heterólogas, de alto valor añadido, como consecuencia de un proceso de expresión de los correspondientes genes, en procesos en los que la proteína se acumula a nivel intracelular. Entre éstas están el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBV) que ha dado origen al desarrollo de una vacuna recombinante ya en el mercado, la proinsulina humana, la superóxido dismutasa humana, proteínas VLP como presentadoras de antígenos del virus HIV1 y el antígeno que ha permitido desarrollar una vacuna contra la malaria. Las posibilidades en este sentido se recogen ampliamente en Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992, Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488.

25 Para la recuperación de estas proteínas heterólogas producidas de forma intracelular normalmente se recurre a la rotura de las células. Los métodos descritos tradicionales para lograr dicha rotura celular son drásticos debido a la dureza de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y pueden consistir en:

30 - rotura mecánica con homogeneizadores a presión (Schütte, H. and Kula, M.R. 1990. Pilot and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:599-620).

- rotura química empleando detergentes químicos (Breddam, K. and Beinfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:323-329).

- rotura enzimática empleando unas mezclas complejas de enzimas líticos (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. Bio/Technology 11:214-217).

5

Estos métodos presentan como inconvenientes la posible degradación de los polipéptidos debido a las altas presiones que pueden sufrir en los homogeneizadores, la posible contaminación que pueden suponer los compuestos químicos utilizados para la extracción de la proteína que no siempre son fáciles de eliminar y, en el caso del uso de
10 enzimas líticos, la contaminación con proteasas (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. Bio/Technology 11:214-217) que suelen estar presentes en los aludidos complejos de enzimas líticos. La alternativa de llevar a cabo una purificación para eliminar las proteasas aumenta el valor del complejo lítico que ya de por sí
15 resulta caro.

El problema técnico cuya resolución nos planteamos es lograr la liberación de proteínas heterólogas producidas intracelularmente en levadura, sin necesidad de tener que realizar un proceso de rotura mecánica, química o enzimática de las células. Para ello nos
20 basamos en el uso de determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* portadoras de la mutación *slt2*, es decir que afecta al gen *SLT2* descubierto y clonado en nuestro laboratorio (Torres, L., Martín, H., García-Sac, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. and Nombela, C. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of
25 *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. Mol. Microbiol. 5:2845-2854; Fuente, J.M., Vázquez, A., González, M., Sánchez, M., Molina, M. and Nombela, C. 1993 Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:763-769).

El gen *SLT2* codifica una proteína con actividad fosforilante de proteínas, que se
30 encuadra en el grupo de las llamadas "Proteína quinasas tipo MAP" (Mitogen Activated Protein) (Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M. and Nombela, C. 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue *Slt2* is critically required for cell integrity at 37°C. Mol. Gen. Genet. 241: 177-184) y que cuya acción biológica parece enmarcarse en una ruta de

transmisión de señales activadas por la proteína quinasa C1, desconociéndose actualmente la señal que desencadena la activación de la ruta así como el sustrato final de la misma.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de abordar la expresión de proteínas heterólogas en levaduras es la posibilidad de degradación proteolítica inespecífica de la correspondiente proteína, producida por acción de las proteasas de la levadura especialmente de las de origen vacuolar como son las codificadas por los genes *PEP4* y *PRB1* (Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. 1993. Increased activity of a model heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* strains with reduced vacuolar proteinases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:211-215; Jones, E.W. 1991. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. Meth. in Enzymol. 194:428-453; Pohlig, G., Zimmermann, W. and Heim, J. 1991. Influence of yeast proteases on hirudin expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biomed. Biochim. Acta 50:711-716). Por ello, también hemos desarrollado cepas más adecuadas para nuestra invención, es decir portadoras del carácter lítico (*slt2*), pero que son también deficientes en proteasas vacuolares.

Los primeros estudios de liberación de proteínas heterólogas de acuerdo con el procedimiento de esta invención se realizaron induciendo la lisis celular mediante un choque térmico, consistente en elevar la temperatura del cultivo desde 24°C a 37°C, alcanzándose a las 6 a 8 horas la máxima liberación de proteínas, por ser ese el tiempo requerido para lograr una lisis del cultivo.

25 EXPLICACION Y DESCRIPCION DE LA INVENCION

El proceso objeto de patente consiste en la utilización de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, deficientes en la función del gen *SLT2*, cuyo fenotipo se caracteriza por:

30

-crecimiento termosensible, de forma que las células se desarrollan bien a 24°C pero dejan de crecer y se lisan cuando se eleva la temperatura a 37°C, produciéndose la lisis celular con liberación del contenido intracelular al medio externo.

-las células mutantes *slt2* resultan protegidas frente a las deficiencias indicadas anteriormente, es decir termosensibilidad y lisis a 37°C, por estabilización osmótica del medio con sorbitol 0.5M o NaCl 1.5%, lo que es indicativo de que la proteína codificada por el referido gen es necesaria para la formación de una pared celular osmóticamente estable a la temperatura de 37°C.

El objetivo de la invención es el aprovechamiento de estas características fenotípicas para lograr la liberación de proteínas heterólogas producidas intracelularmente. Dicha liberación se basa en la lisis celular que se produce en determinadas condiciones y que conduce a la liberación de contenido intracelular que dichas cepas mutantes presentan cuando la temperatura de crecimiento se eleva de 24°C a 37°C o cuando, después de crecer a 37°C pero en medio estabilizado osmóticamente, son sometidas a un choque osmótico por simple resuspensión de las células en un medio carente de dicho estabilizador osmótico. Se obtiene de esta forma una preparación de proteínas, que se separa de los restos del material celular por centrifugación simple, y en la que está presentes las proteínas heterólogas intracelulares en cantidades superiores al 50% del total de proteína intracelular producida.

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* desarrolladas para llevar a cabo la invención son:

- LD1: es una cepa diploide portadora de la mutación *slt2* con las características fenotípicas enunciadas con anterioridad. Su genotipo es: *MATa/MAT α , slt2D-35/slt2D-35, leu2-3.112/leu2-3.112, his4 Δ 34/his4 Δ 34*.

- LHDP1: *MAT a, slt2D-35, ade2-101, leu2-3.112, pep4::HIS3, prb1D1.6R*. Muestra las mismas características fenotípicas referidas a lisis, siendo además deficiente en proteasas vacuolares Pep4 y Prb1 responsables de la proteólisis inespecífica.

Ambas cepas se encuentran depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) sita en la Universidad de Valencia. Los números de acceso son: 10815 para la cepa LD1 y 10816 para la cepa LHDP1.

El procedimiento de liberación de proteínas se puede llevar a cabo según se indica en las Figuras 1 y 2 por una de las siguientes alternativas:

A) Liberación de proteínas por choque osmótico. Las fases del proceso se describen en la Figura 1 (pág.8).

-crecimiento de la cepa mutante en el gen *SLT2* a la temperatura restrictiva de 37°C en presencia de un estabilizador osmótico hasta mitad de la fase exponencial.

-separación de las células del medio de cultivo por centrifugación guardando las células.

-choque osmótico de las células mediante resuspensión de las mismas en agua, lo que conduce a la lisis de las mismas con liberación de las proteínas intracelulares, entre ellas la proteína heteróloga de interés.

-eliminación de los restos celulares por centrifugación obteniéndose una preparación cruda de proteínas intracelulares entre las que se encuentra la proteína de interés, y preparación que es apta para iniciar procesos de purificación.

B) Liberación de proteínas por choque térmico. Las fases del proceso son:

-crecimiento de la cepa mutante en el gen *SLT2* a la temperatura permisiva de 24°C hasta la mitad de la fase exponencial.

-choque térmico del cultivo mediante elevación de la temperatura de crecimiento a 37°C, lo que produce la lisis de las células al cabo 6-8 horas de incubación a esa temperatura, con liberación del contenido intracelular al medio de cultivo.

-separación de los restos celulares del medio de cultivo (que contiene las proteínas liberadas como resultado de la lisis celular) por centrifugación, obteniéndose al igual que en el caso anterior una preparación cruda de proteínas, portadora de la proteína de interés, apta para abordar procesos de purificación.

En la figura 2 (incluida y desarrollada en "Modo de realización de la invención") se explican los parámetros que nos indican que existe lisis del cultivo con liberación del contenido intracelular al medio de cultivo.

Las principales ventajas que presenta la invención son las siguientes:

- permite lograr una liberación suave y rápida de las proteínas evitando el uso de altas presiones en los homogeneizadores (Schütte, H. and Kula, M.R. 1990. Pilot and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:599-620), de productos químicos (Breddam, K. and Beenfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods

FIGURA 1

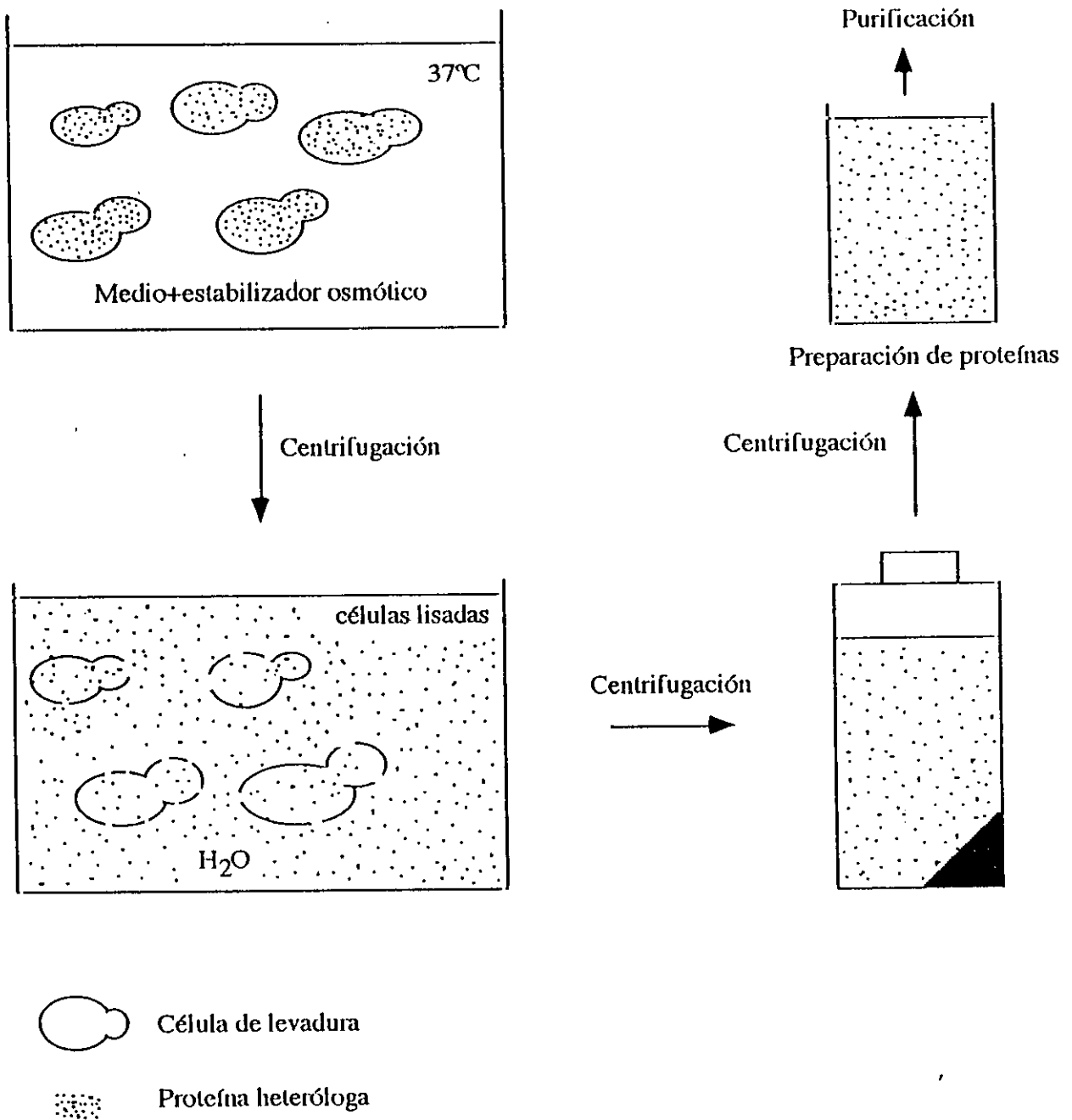


Figura 1: Fases del proceso de liberación de proteínas heterólogas intracelulares de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas en el gen *SLT2* por medio de un choque osmótico.

for production of intracellular enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:323-329) y de enzimas líticos (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. Bio/Technology 11:214-217) para digerir la pared; lo que además se traduce en un abaratamiento del proceso.

- evita las contaminaciones de la preparación de proteínas que se pueden dar en el caso de extracción con productos químicos que añaden impurezas a las preparaciones de proteínas no siempre fáciles de eliminar (Breddam, K. and Beenfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:323-329) o de las contaminaciones con proteasas en el caso de extracción con enzimas líticos que se traduce en degradación de los polipéptidos (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. Bio/Technology 11:214-217).

- la posibilidad de concentrar el volumen de cultivo inicial, al producir el choque osmótico junto al hecho de que las proteínas heterólogas pueden ser expresadas bajo el control de promotores fuertes lo que significa que su proporción relativa puede ser elevada lo que facilita la posterior purificación de la misma.

- la principal ventaja respecto al sistema similar basado en el empleo de la mutación *srb1* es la mayor sensibilidad al choque osmótico de la mutación *slt2* en la que 60-70% de las células se lisan frente a un 20% de las células mutadas en *srb1* (Bröker, M. 1994. Isolation of recombinant proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by use of osmotically fragile mutant strains. Biotechniques 16:604-610).

EXPOSICION DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

A continuación expondremos por medio de un ejemplo, no limitativo de su alcance, un modo de realización de la invención en las dos modalidades expuestas anteriormente.

5

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas son las descritas con anterioridad en el apartado de "Explicación y Descripción de la Invención"; además con carácter optativo se puede utilizar una cepa silvestre para el carácter lítico que sirva de control negativo en el experimento, por ejemplo nosotros hemos utilizado:

10

- BJ5461: es una cepa silvestre para el gen *SLT2* accesible al público en la colección denominada Yeast Genetic Stock Center (Mortimer, R.K. and Contopoulou, R. Yeast Genetic Stock Center Catalogue. Seventh edition 1991). No obstante se puede emplear como cepa control para los experimentos cualquier cepa no lítica.

15

Las tres cepas (LD1, LHDPI y BJ5461) se transforman con el plásmido pCH100L (Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Gene 45:149-158), modificado en nuestro laboratorio introduciendo un marcador *LEU2* (leucina) para poder seleccionar transformantes. El plásmido codifica para la proteína CAT (Cloranfenicol Acetil

20

Transferasa) de origen bacteriano y responsable de la resistencia a cloranfenicol y que es una proteína heteróloga para la levadura y además es producida de forma intracelular y por tanto sólo será detectable en el medio de cultivo como consecuencia de lisis celular.

25

Estudios previos han demostrado una buena estabilidad del plásmido lo que permite trabajar con medio no selectivo tipo YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) que permite un crecimiento más rápido y una mejor expresión del fenotipo lítico.

30

A) Liberación de proteínas por choque osmótico. Las fases del proceso están resumidas en la Figura 1, incluida en el apartado de "Explicación y descripción de la invención".

Las cepas transformadas se cultivan en medio YEPD líquido suplementado con un estabilizador osmótico (sorbitol 0.5M, NaCl 1.5%) a la temperatura de 37°C en un agitador termostatzado hasta la mitad de la fase exponencial. Antes de recoger las células para

separarlas del medio de cultivo se toman muestras de sobrenadante y de células para obtener valores de referencia acerca de la liberación de CAT al medio externo (son negativos debido a que la ausencia de lisis hace que no haya liberación de contenido intracelular al medio externo). Los valores que se van a medir son la actividad de CAT en el extracto celular y en el sobrenadante antes y después del choque osmótico para establecer la cantidad de proteína liberada desde las células al sobrenadante, siguiendo un método colorimétrico descrito por Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 45:149-158). Como se indica en la figura 1 las células son separadas por una centrifugación a 5000rpm durante 5', siendo a continuación resuspendidas en agua, momento en el cual se vuelve a tomar otra muestra separando por centrifugación a 5000rpm 10 min los restos celulares y analizando la cantidad de CAT presente en las células y en sobrenadante mostrándose los datos en la tabla 1, esta preparación obtenida tras la segunda centrifugación deja una preparación de proteínas lista para acometer un proceso de purificación de la proteína de interés.

Como era de esperar la cepa silvestre, en este caso BJ5461, no es osmóticamente sensible y no se observa aparición de actividad CAT en el sobrenadante, a diferencia de las otras dos cepas que sí son sensibles al choque osmótico y que presentan un 60-70% de su actividad en el sobrenadante. Destaca la mayor productividad de la cepa LHDPI en concordancia con lo publicado en otros trabajos (Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992, Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488; Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. 1993. Increased activity of a model heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* strains with reduced vacuolar proteinases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:211-215). Estos datos están apoyados en medidas paralelas de proteína total presente en los extractos celulares y en los sobrenadantes siguiendo el método colorimétrico descrito por Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254, mostrando perfiles similares a los de la actividad CAT.

TABLA 1

	ACTIVIDAD CAT (UE/ml)				
	YEPD+ sorbitol 37°C		H ₂ O		
	Extracto celular	Sobrenadante	Extracto celular	Sobrenadante	
Cepas					%CAT §
BJ5461	100	n.d.	98	n.d.	0
LD1	75	n.d.	23	50	70
LHDP1	220	n.d.	80	130	60

n.d.: no detectado

§:%CAT liberado al sobrenadante

Tabla 1: Liberación de la proteína heteróloga CAT por choque osmótico de cepas *slt2*. Se tomaron muestras de igual densidad celular y la actividad CAT fue determinada en: extracto celular (antes y después del choque osmótico), sobrenadante de medio de cultivo o de agua en la que se resuspendieron las células después del choque osmótico.

B) Liberación de proteínas por choque térmico. Los datos obtenidos en experimentos tipo se muestran en la Figura 2.

Los experimentos en esta modalidad se han realizado utilizando un fermentador con cuba de 10l de volumen de trabajo modelo BIOSTAT E (Braun); lo que confiere a los resultados un valor adicional ya que un fermentador de estas características representa una escala superior a la del matraz y se acerca a la escala de planta piloto.

Las condiciones de cultivo fueron:

-medio de cultivo YEPD

-temperatura: inicial de 24°C elevándose la misma a 37°C a la mitad de la fase exponencial, para provocar la lisis y la consiguiente liberación de proteínas al medio de cultivo.

-datos técnicos:

-el inóculo se obtenía cultivando las células a 24°C en medio mínimo sin leucina para asegurar un 100% de células portadoras del plásmido. Su volumen era de 500ml y correspondía a un cultivo en fase estacionaria.

-el cultivo era de tipo discontinuo (batch).

-la velocidad de agitación era de 300rpm, el pH oscilaba entre 4 y 6, el flujo de entrada de aire 5 l/min.

-toma de muestras: se realizaron tomas periódicas a 24° y 37°C con el fin de seguir la evolución de la densidad óptica y la viabilidad del cultivo. Además para evaluar la proteína total y la actividad enzimática CAT se tomaron una o dos muestras antes del choque térmico y tras este a intervalos más cortos al principio (3horas) incrementándose hasta las 24-30 horas posteriores al cambio de temperatura.

Con las condiciones mencionadas anteriormente el cultivo se mantenía a 24°C hasta una densidad óptica entre 1 y 1.5; en ese momento se cambiaba la temperatura del cultivo a 37°C para provocar la lisis de las células. Lo anterior y lo expuesto a continuación se refiere a datos mostrados en la figura 2 en sus diferentes apartados. Para seguir la lisis se evaluaron los diferentes parámetros:

-lisis celular, que lógicamente significa la muerte celular, se medía siguiendo un método desarrollado en nuestro laboratorio consistente en medir el porcentaje de población celular que es teñida por el fluorocromo yoduro de propidio mediante la técnica de citometría de flujo (Fuente, J.M., Alvarez, A., Nombela, C. and Sanchez, M. 1992. Flow

cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. Yeast 8:39-45) y que equivale a un perfil de la viabilidad del cultivo.

5 -al igual que en el caso de liberación de proteínas por choque osmótico se medía la actividad enzimática de CAT y la proteína total. Se considera proteína liberada al incremento sobre el valor basal medido en el cultivo a 24°C inmediatamente antes de cambiar la temperatura a 37°C.

10 Los resultados expuestos en la figura 2 (pág.15) corresponden a fermentaciones tipo de las cepas LD1 y LHDP1. Las gráficas A (LD1) y C (LHDP1) a sendas fermentaciones realizadas a 24°C con el objeto de seguir el perfil de dichas cepas a su temperatura permisiva y poder establecer que en ningún momento se produce ni lisis (no se observa disminución del perfil de viabilidad) ni, por tanto, liberación de proteínas al medio de cultivo (la actividad CAT únicamente es detectable en el extracto celular, es decir en el interior de las células). Se puede decir que son dos fermentaciones que sirven de control para la comparación con las
15 fermentaciones realizadas con choque térmico en las mismas cepas que nos permiten evaluar con más precisión el efecto de dicho choque térmico. En las gráficas B (LD1) y D (LHDP1), correspondientes a fermentaciones con choque térmico, se observan los siguientes fenómenos tras el cambio de temperatura, representado por un trazo vertical continuo en la gráfica:

20 -en ambas se observa una acusada pérdida de viabilidad hasta niveles en torno al 20 a 30% de células viables, como resultado de la expresión del fenotipo de la mutación en el gen *SLT2* a la temperatura de 37°C.

-las dos cepas presentan liberación de proteínas al medio externo representada por el incremento observado en las proteínas totales, medidas por el método Bradford (Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254), y en la actividad enzimática CAT (Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 45:149-158). Sin embargo la estabilidad de la enzima CAT demuestra ser superior en la cepa LHDP1 que en la LD1, debido probablemente a no estar expuesta a la
30 acción de las proteasas vacuolares Pep4 y Prb1 en el caso de la cepa LHDP1.

-al igual que en el caso del choque osmótico la separación de los restos celulares por centrifugación deja una preparación cruda de proteínas apta para emprender un proceso de purificación.

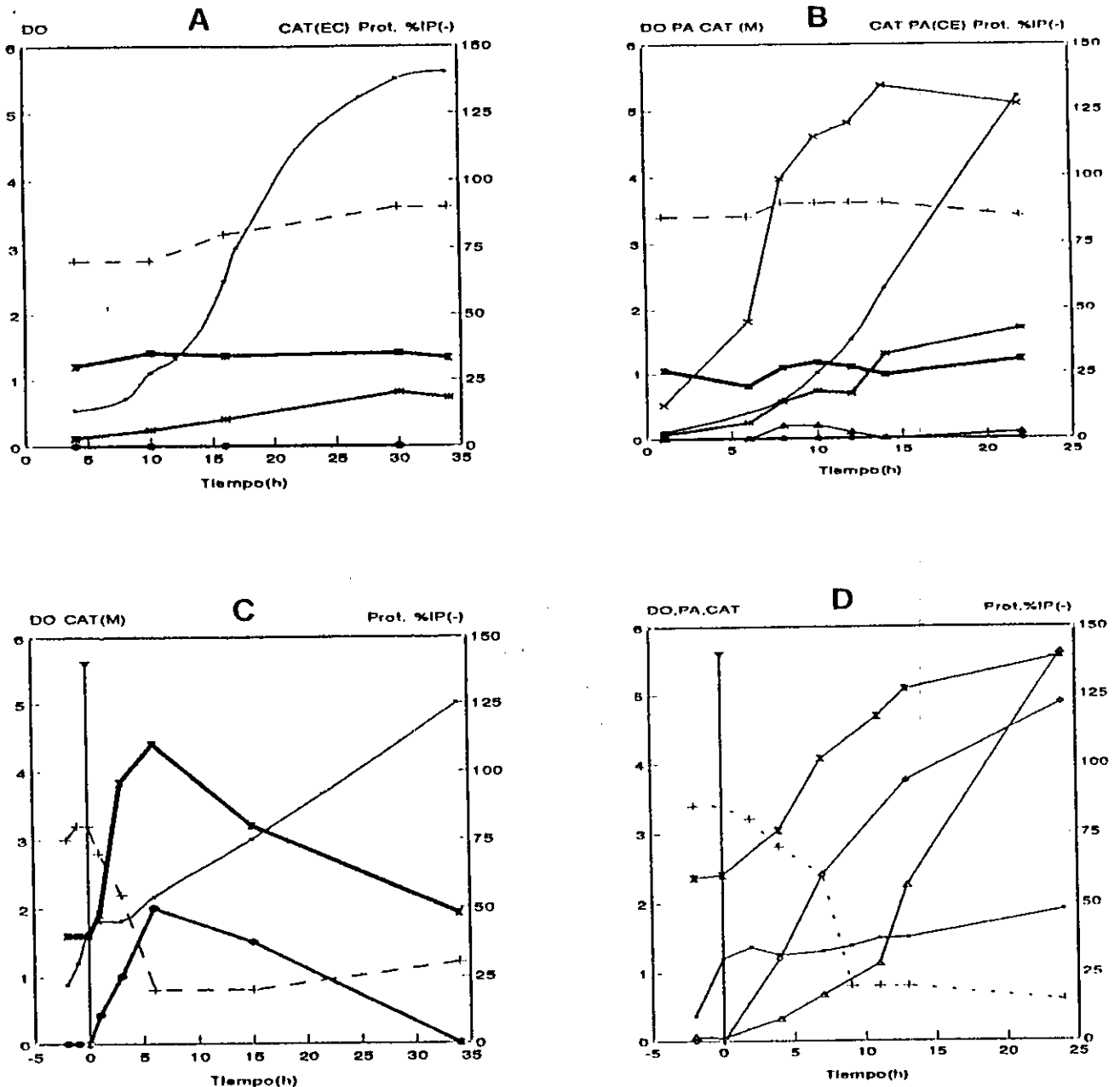


Figura 2. Liberación de proteínas homólogas y heterólogas de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* LDI (A,C) y LIDPI (B,D) transformadas con el plásmido pCH100L en condiciones de expresión de la mutación *slt2*. Cultivos realizados en un fermentador de 10l incubados a 24°C todo el cultivo (A y B) o cambiados a 37°C (C y D) (▼, cambio de temperatura). Los parámetros medidos fueron: +, viabilidad medida como porcentaje de células IP(-), -, Densidad Óptica a 600 nm (DO); X, Proteína total en el medio de cultivo (Prot.); *, actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en extractos celulares (EC) y ●, medio de cultivo (M) como unidades por mililitro; x, actividad fosfatasa alcalina (PA) en extractos celulares (EC) y ▲, medio de cultivo (M) como unidades por mililitro.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de proteínas heterólogas y otros materiales intracelulares (como
5 productos particulados tipo VLP) basado en el empleo de estirpes mutadas en genes que afectan a la integridad celular lo que da lugar a la liberación el contenido intracelular por expresión de la correspondiente mutación.

2.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación número 1 basado en la sensibilidad osmótica que confieren
10 a las células mutaciones como las que afectan al gen *SLT2* generalmente a temperaturas no permisivas como la de 37°C.

3.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación números 1 y 2 para la obtención de preparaciones de
15 proteínas heterólogas y productos particulados intracelulares realizado por cualquier técnica que, produciendo la expresión de la mutación correspondiente, conduzca a la pérdida de integridad celular por la sensibilidad osmótica de las células.

20 4.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en las que la expresión de las mutaciones según la reivindicación número 3 puede provocarse en las células capaces de expresar proteínas heterólogas o productos intracelulares particulados (es decir transformadas con el gen o genes correspondientes) mediante choque
término de cultivos, es decir elevación de la temperatura hasta niveles no permisivos en
25 medios no protegidos osmóticamente, o por choque osmótico de células incubadas a temperatura no permisiva en medio osmóticamente protegido.

5.- Procedimiento para la obtención de proteínas heterólogas intracelulares y
productos particulados de otras especies de levadura diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*
30 en mutantes autolíticos, afectados en genes homólogos del gen *SLT2* o en otros cuya mutación determine pérdida de la integridad celular, usando un choque osmótico o un choque
término.